

TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT CỦA PHYTASE TÁI TỔ HỢP

Đỗ Thị Ngọc Huyền¹, Nguyễn Thị Hồng Hà¹, Trương Nam Hải², Nguyễn Thùy Châu¹

¹Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

²Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Phytate là dạng dự trữ chính của phosphorus và chiếm hơn 80% trong tổng số phosphorus có ở một số thực vật. Chúng hoạt động như tác nhân kháng dinh dưỡng bằng việc hình thành phức không hòa tan với protein và ion kim loại trong đường tiêu hóa dẫn đến ngăn cản sự hấp thụ muối khoáng của động vật dạ dày đơn. Bởi vậy, việc thêm phytase vào thức ăn gia súc không chỉ nâng cao hiệu quả tận dụng phosphate mà còn làm giảm sự ô nhiễm phosphorus ở các khu chăn nuôi tập trung. Gen *phyC* mã hóa cho phytase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* B1 đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu các tính chất của enzyme tái tổ hợp nhằm mục đích sử dụng chúng trong thức ăn chăn nuôi. Kết quả phytase tái tổ hợp được tinh sạch qua cột sắc ký His-tag có khối lượng phân tử khoảng 47 kDa trên điện di gel polyacrylamide. pH và nhiệt độ tối ưu cho phytase tái tổ hợp hoạt động là 6,5 và 55 °C khi bổ sung 1 mM CaCl₂. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của các chất khử và ion kim loại đã chỉ ra enzyme này bị ức chế mạnh mẽ bởi EDTA và ion Cu²⁺. Việc thêm Ca²⁺ vào PhyC đã giúp tăng khả năng bền nhiệt của nó. Enzyme này nhạy cảm với pepsin, ngược lại rất bền với trypsin. Giá trị K_m với cơ chất sodium phytate là 0,48 mM, V_{max} 180 μmol/phút.

Từ khóa: *E. coli* BL21, Phytate, phytase tái tổ hợp, tính chất, tinh sạch

MỞ ĐẦU

Một trong số những nguyên tố khoáng đa lượng rất cần cho sự phát triển của người và vật nuôi là phosphorus, bởi vì phosphorus cũng như nitơ là những thành phần cơ bản tạo nên nucleic acid và các hợp chất sinh học khác. Tuy nhiên, phosphorus không có chu trình tái tạo lại bởi trái đất như nitơ. Ở cơ thể người cũng như cơ thể động vật, phosphorus và các nguyên tố khoáng cần thiết khác được cung cấp chủ yếu qua con đường thức ăn. Đa số thức ăn cho động vật có nguồn gốc từ các hạt thực vật, đặc biệt là ngũ cốc và các loại hạt đều có chứa phosphorus nhưng chúng nằm ở dạng phân tử phytate hoặc phytic acid. Phytic acid khi kết hợp với các ion kim loại như Fe³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺... sẽ ngăn cản khả năng kết hợp của các ion kim loại này với các acid béo không no làm giảm khả năng tiêu hóa thức ăn của động vật, gây ra hiệu ứng kháng dinh dưỡng. Bên cạnh đó, do không hấp thu được lượng phosphorus có sẵn trong phytic acid nên thức ăn cho động vật dạ dày đơn thường phải bổ sung thêm phosphorus. Lượng phosphorus không được động vật tiêu hóa hết bị thải ra ngoài theo phân của chúng đã làm ô nhiễm môi trường. Điều này là nguyên nhân gây nên hiện tượng tảo nở

hoa bùng phát, ảnh hưởng đến sự phát triển của các loài thủy sản... (Sharpley *et al.*, 1994).

Phytase là một enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân phytic acid thành myo - inositol và một số gốc phosphate vô cơ tự do. Các chất này dễ dàng được hấp thụ bởi các động vật dạ dày đơn. Chính vì vậy, việc bổ sung phytase vào thức ăn cho vật nuôi không những cho phép chúng đồng hóa tốt thành phần phosphorus sẵn có trong thức ăn, tăng sự hấp thụ protein và các nguyên tố khoáng mà còn giảm được sự ô nhiễm môi trường (Igbasan *et al.* 2001).

Các chủng vi sinh vật tự nhiên thường sản xuất rất ít phytase, do đó để nâng cao được năng suất phytase chỉ bằng cách áp dụng những thành tựu của công nghệ sinh học như là đưa các gen mã hóa cho phytase của vi sinh vật và thực vật vào biểu hiện mức độ lớn ở các hệ biểu hiện khác nhau (Hegeman và Grabau (2001); Zinin và đồng tác giả (2004). Gen *phyC* của chủng *B. subtilis* B1 đã được đưa vào biểu hiện trong *E. coli* nhằm thu nhận lượng lớn phytase tái tổ hợp (Đỗ Thị Ngọc Huyền *et al.*, 2006).

Để có thể đưa PhyC tái tổ hợp vào sản xuất thức ăn chăn nuôi, trong bài báo này chúng tôi tiến hành tinh sạch và xác định một số tính chất của PhyC tái tổ hợp nói trên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 [E *omp hsd SB(rBmB)gal dcm (DE3)* plysS(Caml)] được sử dụng làm chủng biểu hiện.

Plasmid

Plasmid tái tổ hợp pETphyC: gen *phyC* của *B. subtilis* không chứa trình tự mã hóa cho đoạn peptide dẫn được đưa vào plasmid pET22b(+) để biểu hiện trong *E. coli* BL21.

Môi trường

LBA lỏng: NaCl: 1%; Tryptone: 1%; yeast extract: 0,5%; Ampicillin (100 µg/ml).

Phương pháp nghiên cứu

Biểu hiện phytase tái tổ hợp

Chọn một khuẩn lạc mọc riêng rẽ và nuôi cấy qua đêm trong môi trường LBA ở 37°C, 200 v/p. Chuyển dịch nuôi cấy qua đêm vào môi trường LBA với tỷ lệ 1%, nuôi cấy ở cùng điều kiện trên trong khoảng 2 h đến khi OD₆₀₀ đạt khoảng 0.6. Bổ sung IPTG vào môi trường nuôi cấy để nồng độ cuối cùng đạt 1mM, tiếp tục nuôi cấy trong 4 h ở 30°C, 200 v/p để chủng sinh tổng hợp phytase. Thu tế bào bằng cách ly tâm 6000 v/p, 5 phút. Hòa tế bào lại với đệm mẫu và kiểm tra hàm lượng protein.

Tinh sạch phytase tái tổ hợp qua cột sắc ký ái lực His-tag

Nguyên tắc: Cột sắc ký ái lực chứa hạt gel mang ion Ni²⁺. Tại pH trung tính (pH 7), protein chứa histidine amino acid có khả năng tạo liên kết tĩnh điện với ion kim loại Ni²⁺, giúp protein có gốc histidine được giữ lại trên gel. Khi pH chuyển sang trạng thái acid, proton H⁺ sẽ tranh chấp với Ni²⁺ giúp đẩy protein ra ngoài.

Quy trình: Tinh sạch protein được thực hiện theo các bước: 1) Cặn tế bào thu được sau khi biểu hiện được hòa lại trong dịch rửa, bổ sung thêm PMSF để ức chế protease. 2) Siêu âm phá tế bào ở bước sóng 8 µ trên đá, 5 phút với chu kỳ: 10 giây siêu âm, 10 giây nghỉ. 3) Ly tâm dịch tế bào ở 13000 v/p trong 5 phút. Thu dịch nổi có chứa protein tái tổ hợp cho qua cột sắc ký ái lực. 4) Rửa cột bằng dịch rửa với thể tích bằng 5 lần thể tích mẫu. 5) Bổ sung dịch mẫu lên cột, thu protein theo phân đoạn. 6) Kiểm tra các

phân đoạn protein đã thu trên gel polyacrylamide 12,5%.

Điện di SDS-PAGE

Điện di protein tái tổ hợp được thực hiện theo phương pháp của Laemmli (1970). Sau khi điện di, gel được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue. Trọng lượng phân tử protein được xác định bằng protein chuẩn của hãng Fermentas.

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein trong mẫu được xác định theo phương pháp của Bradford (1976) bằng việc sử dụng albumin huyết thanh bò làm chuẩn.

Xác định hoạt tính của Phyc tái tổ hợp

Hoạt độ phytase được xác định theo phương pháp của Shimizu (1992) bằng cách ủ 150 µl dịch phytase đã tinh sạch với 600 µl sodium phytate 2 mM có bổ sung CaCl₂.2H₂O 2 mM ở 37°C trong thời gian 20 phút. Dừng phản ứng bằng cách thêm 5% trichloroacetic acid. Lượng các gốc phosphate vô cơ được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng λ = 700 nm dựa trên cường độ màu tạo ra bởi phức với thuốc thử. Dựa vào đồ thị chuẩn của sodium phosphate dibasic để tính lượng sản phẩm tương ứng do enzyme xúc tác tạo nên. Kết quả hoạt độ enzyme được tính theo phương trình đường chuẩn.

Định nghĩa đơn vị hoạt độ enzyme: Một đơn vị hoạt độ phytase là lượng enzyme xúc tác phản ứng thủy phân để giải phóng ra 1 µmol phosphate vô cơ trong thời gian 1 phút trong các điều kiện của phương pháp này.

Xác định tính chất Phyc tái tổ hợp

Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến hoạt độ và độ bền pH của phytase, ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ phytase bằng cách cho dịch enzyme phản ứng với cơ chất sodium phytate ở các dải nhiệt độ, pH khác nhau, giữ nguyên các điều kiện khác của phản ứng. Các loại đệm được sử dụng để xác định ảnh hưởng của pH đến hoạt độ phytase là glycine - HCl (pH 3 - 4); sodium acetate (pH 4 - 6) và Tris-HCl (pH 7 - 9).

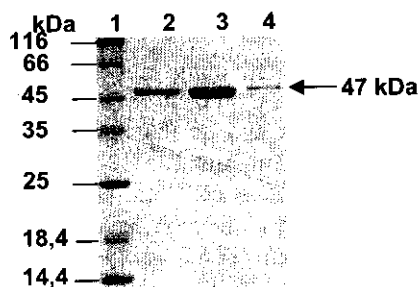
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh sạch enzyme tái tổ hợp

Với mục đích thu nhận một lượng lớn phytase

tinh sạch dùng để xác định các tính chất enzyme, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch phytase qua cột sắc ký ái lực. Do trên vector pET 22b(+) đã được thiết kế sẵn một trình tự mã hóa cho 6 histidine aminoacid nằm liền nhau ngay sau vùng đa nối cho nên rất thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp.

Sản phẩm protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE 12,5%. Kết quả điện di sau khi tinh sạch, PhyC tái tổ hợp được thể hiện bằng một băng duy nhất có trọng lượng phân tử khoảng 47 kDa trên gel polyacrylamide (Hình 1).



Hình 1. Tinh sạch phytase tái tổ hợp. 1: Marker chuẩn; 2 - 4: Phytase tái tổ hợp được tinh sạch ở các phân đoạn khác nhau.

Chúng tôi đã xác định hàm lượng protein của các phân đoạn tinh sạch thu được bằng phương pháp Bradford (1976). Kết quả cho thấy lượng protein tinh sạch trong các phân đoạn thu được nằm trong khoảng 125 - 153 $\mu\text{g/ml}$. Lượng protein này được sử dụng để xác định các tính chất của enzyme.

Xác định hoạt tính của PhyC tái tổ hợp

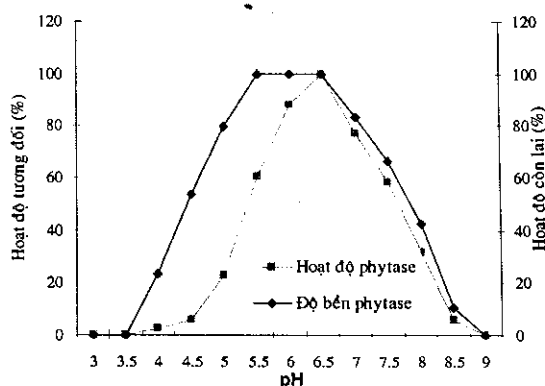
Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ và độ bền của PhyC tái tổ hợp

Để có thể sử dụng PhyC tái tổ hợp cho chăn nuôi, điều quan trọng đầu tiên cần phải khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến enzyme này xem chúng có phù hợp với các điều kiện của một enzyme chăn nuôi hay không? Một trong các yếu tố cần quan tâm đầu tiên là ảnh hưởng pH đến hoạt độ và độ bền của enzyme.

Quá trình khảo sát được thực hiện bằng cách cho PhyC sau khi tinh sạch (bổ sung CaCl_2 1 mM) phản ứng với cơ chất sodiumphytate ở các pH khác nhau từ 3 - 9, bằng việc sử dụng các đệm glycine - HCl (pH 3 - 4); sodium acetate (pH 4 - 6) và Tris-HCl (pH 7 - 9). Kết quả trên hình 2 cho thấy PhyC tái tổ

hợp có khả năng hoạt động mạnh trong khoảng pH từ 5,5 - 7 và enzyme này hoạt động tối ưu ở pH 6,5.

Ngoài ra khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến độ bền của PhyC tái tổ hợp cũng cho thấy enzyme này khá bền trong giải pH từ 5,5 - 6,5. Chính vì PhyC tái tổ hợp hoạt động tốt ở pH 5,5 - 7 cho nên enzyme này thích hợp để bổ sung vào thức ăn cho gia cầm bởi vì điều của gia cầm có pH từ 6 - 7.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ và độ bền của PhyC tái tổ hợp.

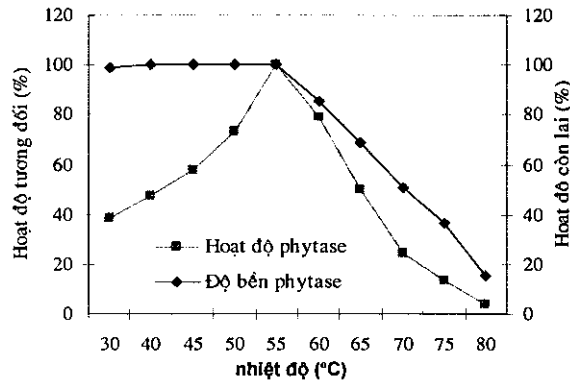
Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ bền nhiệt đến hoạt độ của PhyC tái tổ hợp

Bên cạnh việc xác định ảnh hưởng của pH đến hoạt độ PhyC tái tổ hợp, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra khả năng chịu nhiệt của enzyme này thông qua việc đo hoạt độ còn lại của chúng ở các nhiệt độ khác nhau từ 30°C đến 80°C. Kết quả ở hình 3 cho thấy PhyC tái tổ hợp hoạt động tốt ở 55°C, cao hơn so với nhiệt độ được báo cáo từ chủng *B. subtilis* VTT E-68013 (50°C) nhưng thấp hơn so với phytase từ chủng *Bacillus* sp. DS11 (70°C) (Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998).

Để kiểm tra tính bền nhiệt, PhyC tái tổ hợp được ủ với CaCl_2 1 mM ở các nhiệt độ khác nhau, sau đó làm lạnh ở 4°C và phân tích chúng ở điều kiện tiêu chuẩn. Kết quả ở hình 3 cho thấy enzyme không bị mất hoạt tính trong thời gian 20 phút từ nhiệt độ 55°C trở xuống và hoạt độ enzyme vẫn còn 85% sau 20 phút ủ ở 60°C.

Tóm lại, PhyC tái tổ hợp hoạt động tốt ở nhiệt độ tối ưu là 55°C và pH tối ưu là 6,5 trong khi nhiệt độ và pH tối ưu cho phytase thô từ chủng *B. subtilis* B1 hoạt động là 50°C và 6,5. Nhìn chung phytase từ chủng tự nhiên và PhyC tái tổ hợp có khả năng chịu

hiệt và pH tương đối giống nhau. Trong một số nghiên cứu người ta cũng đã chứng minh được rằng các đặc tính sinh hóa của PhyC tái tổ hợp tương tự như phytase tự nhiên.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ và độ bền của PhyC tái tổ hợp.

Ảnh hưởng của các ion kim loại và chất khử đến PhyC tái tổ hợp

Ảnh hưởng của ion kim loại và chất khử đến hoạt độ PhyC tái tổ hợp được kiểm tra bằng cách sử dụng sodium phytate làm cơ chất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của ion kim loại và chất khử đến hoạt độ PhyC.

Ion kim loại	Hoạt độ PhyC tương đối (%)
Đối chứng	100
MgCl ₂	86
MnCl ₂	55
CaCl ₂	100
CuCl ₂	9
NiCl ₂	16
PMFS	98
EDTA	4

Hoạt độ của PhyC tái tổ hợp bị giảm mạnh mẽ khi có mặt EDTA và Cu²⁺, còn PMSF ít ảnh hưởng đến enzyme này (Bảng 1). Nhìn chung, tất cả ion kim loại được thử ở trên với nồng độ 1 mM đã ức chế phytase ngoại trừ Ca²⁺. Điều này cũng đã được Ha và Oh (2000) khẳng định trong nghiên cứu cấu trúc của phytase từ chủng *B. amyloliquefaciens*. Tác

giả này đã cho rằng, ion canxi có vai trò quan trọng trong cấu trúc và hoạt tính của phytase. Một vài tác giả khác cũng đã chỉ ra ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính của phytase, trong đó EDTA, Zn²⁺, Cu²⁺ và Al³⁺ ức chế mạnh phytase từ chủng *B. subtilis* natto và *Bacillus* sp. DS11 (Shimizu, 1992; Kim *et al.*, 1998).

Tác động của PhyC tái tổ hợp lên các cơ chất thức ăn chăn nuôi

Để sử dụng phytase bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, điều quan trọng nhất là phải thử nghiệm khả năng thủy phân phytic acid có trong các cơ chất thường dùng làm thức ăn.

Chúng tôi đã sử dụng một số cơ chất thường được dùng làm thức ăn chăn nuôi như cám gạo, bột đậu tương và bột ngô để thử nghiệm. Các cơ chất này được hấp thanh trùng ở 100°C trong 10 phút nhằm loại bỏ phytase của thực vật có sẵn trong cơ chất. Cơ chất này được làm lạnh và hòa tan trong đệm sodium acetate pH 6,5 với tỷ lệ 1% (w/v) rồi bổ sung 2 U/ml PhyC tái tổ hợp, để phản ứng ở 55°C trong 1 h rồi xác định lượng phosphorus vô cơ được giải phóng ra. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của PhyC tái tổ hợp lên các cơ chất.

Cơ chất	Phosphorus vô cơ được giải phóng trong 1 g cơ chất (μmol/g)
Sodium phytate	9,5
Cám gạo	3,6
Bột đậu tương	2,5
Bột ngô	2,8

Kết quả ở bảng 2 chỉ ra rằng, PhyC tái tổ hợp có tác động đến tất cả các cơ chất thức ăn được thử, trong đó lượng phosphorus vô cơ được giải phóng ra nhiều nhất là cám gạo, đạt 3,6 μmol/g. Kết quả trên có thể là do trong số các cơ chất trên, cám gạo có chứa nhiều phytic acid nhất cho nên khi PhyC tái tổ hợp tác động vào lượng phosphorus vô cơ được giải phóng ra là lớn hơn cả. Theo số liệu của tác giả Tyagi và Verma (1998) cám gạo là cơ chất có chứa nhiều phytic acid nhất, chiếm 80% tổng số phosphorus của bản thân chúng, trong khi đó đậu tương và bột ngô chỉ chiếm 60% và 72% theo thứ tự. Điều này cũng phù hợp với kết quả đã được Kerovuo và đồng tác giả (1998), Ngô Thanh Xuân và Mai Thị Hằng (2006) đưa ra khi thử nghiệm phytase tự nhiên

từ chi *Bacillus* và phytase của chủng nấm mốc *Aspergillus niger* XP.

Ảnh hưởng của trypsin và pepsin đến PhyC tái tổ hợp

Để khẳng định một cách chắc chắn PhyC tái tổ hợp có thể sử dụng để bổ sung trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi hay không, chúng tôi cũng đã tiến hành thử độ bền của chủng với hai enzyme quan trọng của đường tiêu hóa là pepsin và trypsin.

Như đã trình bày trong phần phương pháp, chúng tôi đã sử dụng PhyC sau khi tinh sạch qua cột His-tag được bổ sung pepsin và trypsin với tỷ lệ 1% (w/w) ở 37°C trong 1 h, sau đó cho hỗn hợp trên phản ứng sodium phytate để xác định hoạt độ phytase còn lại sau khi phản ứng với hai enzyme trên. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của trypsin và pepsin lên PhyC tái tổ hợp.

Dung dịch	Hoạt độ phytase còn lại (%)
Pepsin + PhyC	23
Trypsin + PhyC	100

Kết quả trong bảng 3 đã chỉ ra rằng, PhyC tái tổ hợp không bị tác động bởi trypsin bởi vì khi ủ enzyme này với trypsin trong 1 h, hoạt độ PhyC tái tổ hợp vẫn còn lại là 100%. Trong khi đó, Papp - phytase tái tổ hợp được sinh tổng hợp bởi vi khuẩn *Pseudomonas putida* thì lại bị bất hoạt bởi enzyme này (Dharmsthiti *et al.*, 2005).

Ngoài ra, PhyC tái tổ hợp cũng miễn cảm với pepsin vì hoạt độ PhyC còn lại sau khi xử lý với pepsin trong 1 h chỉ còn 23%. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả chạy điện di trên gel polyacrylamide (không thông báo) khi bản gel chỉ thể hiện một băng phytase được xử lý với pepsin rất mảnh trong khi băng phytase không được xử lý với pepsin rất lớn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp kết quả nghiên cứu của Kerovuo *et al.*, 1998 khi cho rằng phytase từ *B. subtilis* VTT E-68013 bị bất hoạt bởi pepsin.

Mặc dù PhyC bị bất hoạt bởi pepsin nhưng xu hướng chung hiện nay là sản xuất những chế phẩm đa enzyme (multi enzyme) cho nên việc kết hợp giữa phytase của nấm mốc với phytase của vi khuẩn sẽ giải quyết được vấn đề trên.

Động học enzyme

Theo một số tài liệu đã công bố, phytase của *B. subtilis* có tính đặc hiệu cơ chất cao đối với phytic acid và các phytase này đều tuân theo phương trình của Michaelis-Menten (Powar, Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992). Chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng chuyển hóa sodium phytate ở các nồng độ và thời gian khác nhau. Kết quả PhyC tái tổ hợp cũng tuân theo phương trình của Michaelis-Menten và giống hầu hết các phytase của chi *Bacillus*. Giá trị K_m , V_{max} của PhyC tái tổ hợp được xác định là 0,48 mM và 180 μ mol/phút. Trong khi đó, giá trị K_m của phytase đối với sodium phytate của *Bacillus* sp. DS11 là 0,55 mM và *B. subtilis* natto được báo cáo là 0,5 mM (Kim *et al.*, 1998; Shimizu, 1992).

Nhìn chung, các tính chất của PhyC tái tổ hợp rất thích hợp dùng trong việc sản xuất chế phẩm đa enzyme để bổ sung vào thức ăn cho động vật dạ dày đơn nhằm làm tăng khả năng hấp thụ phosphorus và muối khoáng sẵn có trong thức ăn của chúng. Việc sử dụng kết hợp giữa phytase của nấm mốc với phytase bị bất hoạt bởi enzyme đường tiêu hóa và chúng có thể hoạt động tốt cả pH ở dạ dày (nơi mà phytase của vi khuẩn không hoạt động được) cũng như pH ở ruột non (nơi phytase của nấm mốc bị mất hoạt tính).

KẾT LUẬN

Phytase tái tổ hợp được tinh sạch qua cột sắc ký ái lực. Enzyme này hoạt tính phytase tối ưu ở nhiệt độ 55°C và pH 6,5. Giá trị K_m = 0,48 mM/ml, V_{max} = 180 μ M/phút

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của đề tài KC-04-20 và đề tài Nghiên cứu cơ bản - Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Thị Ngọc Huyền, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, Nguyễn Thùy Châu (2006) Nghiên cứu các điều kiện để nâng cao biểu hiện gen phytase bằng chủng *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(2): 187-193.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Dharmstithi S, Chalermponpaisarn S, Kiattiyajarn M, Chanpokaipaboon A, Klongsithidej Y, Techawiparut J (2005) Phytase production from *Pseudomonas putida* harbouring *Escherichia coli* *appA*. *Process Biochem* 40: 789-793.
- Ha NC, Oh BH (2000) Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium loaded states. *Nat Struct Biol* 7: 147-153.
- Hegeman CE, Grabau EA (2001) A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol* 126: 1598-1608.
- Igbasan FA, Simon O, Miksch G, Monjner K (2001) The effectiveness of an *Escherichia coli* phytase in improving phosphorus and calcium bioavailabilities in poultry and young pigs. *Arch Anim Nutr* 54: 117-126.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 2079-2085.
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. D11. *Enz Microb Technol* 22: 2-7.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Ngô Thanh Xuân, Mai Thị Hằng (2006) Nghiên cứu khả năng lên men bề mặt của *Aspergillus niger* XP trên bã sắn để thu phytase dùng cho chăn nuôi động vật dạ dày đơn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 94(2): 38-40.
- Powar VK, Jagannathan V (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 151: 1102-1108.
- Sharpley AN, Chapra SC, Wedepohl R, Sims JT, Daniel TC, Reddy KR (1994) Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: Issues and options. *J Environ Qual* 23: 437-451.
- Shimizu M (1992) Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1266-1269.
- Tyagi PK, Verma SVS (1998) Phytate phosphorus content of some common poultry feed stuffs. *Ind J Poult Sci* 33 (1): 86-88.
- Zinin NV, Serkina AV, Gelfand MS, Shevelev AB, Sineoky SP (2004) Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiol Lett* 236: 283-290.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT PHYTASE

Do Thi Ngoc Huyen¹, Nguyen Thi Hong Ha¹, Truong Nam Hai², Nguyen Thuy Chau^{1,*}

¹Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post-harvest Technology

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Phytate is the major storage form of phosphorus. It accounts for more than 80% of the total phosphorus in some plant. Phytate acts as an anti-nutrient factor by forming insoluble complexes with protein and metal ions in the intestinal tract, thereby prevents mineral absorption of monogastric animals. Therefore, the addition of phytase to animal feed does not only enhance the efficiency of phosphate utilization but also reduce the phosphorus pollution in areas of intensive animal production. The *phyC* gene coding for phytase derived from *B. subtilis* B1 was expressed successfully in *E. coli* BL21 cells. In this report, we studied the characteristics of recombinant phytase to use in animal feed. As a result, phytase, purified by Hig tag column chromatographies, had an estimated molecular weight of 47 kDa on SDS - polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for recombinant phytase activity were 6.6 and 55°C, respectively, with 1 mM CaCl₂. Study on the effect of chelating agent and metal ions showed that the enzyme was strongly inhibited by EDTA, Cu²⁺ ion. Addition of Ca²⁺ ion to the PhyC helped increase its temperature stability. This enzyme was sensitive to pepsin, whereas it was highly stable with trypsin. The K_m value for sodium phytate as the substrate was 0.48 mM, a V_{max} of 180 μmol/min.

Keywords: Characterization, *E. coli* BL21, phytate, recombinant phytase

* Author for correspondence: Tel: 84-4-9342487; Fax: 84-4-8269862; E-mail: ntchau2005@yahoo.com