



PHÂN LẬP NẤM *Aspergillus fumigatus* VỚI KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP PHYTASE CAO

Nguyễn Thị Hà¹ và Nguyễn Văn Tính²

¹ Khoa Sư Phạm, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 31/07/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

Title:

Isolation of *Aspergillus fumigatus* for high level of phytase production

Từ khóa:

Nấm *Aspergillus fumigatus*, phytase ngoại bào, phytate, vùng ITS

Keywords:

Aspergillus fumigatus, extracellular phytase, ITS region, phytate

ABSTRACT

Phytases are acid phosphatase enzymes, which efficiently cleave phosphate moieties from phytate molecules, thereby generating inorganic phosphate, the essential phosphorus nutrient for organisms. *Aspergillus fumigatus* is a potential source of extracellular phytase that adopted a special characteristic of high ability in refolding after heat denaturation. This capability is appropriate for feed production. Thus, isolation of *A. fumigatus* for phytase production is necessary. The result indicated that there were 8 strains isolated from 5 rice soil samples, however, there were 3 isolates designated as ET3, ET7 and ET8 producing high phytase activity on selective M2 medium at 30°C. Among them, ET3 showed the best growth at high temperature (45°C) and its morphological characteristics was similar to morphological characteristics of published *A. fumigatus*. ET3 was identified by molecular biology based on gene sequencing of ITS region. The result showed that the ET3 isolate belonged to an *Aspergillus fumigatus* species that its homology was 98%.

TÓM TẮT

Phytase là enzyme có khả năng thủy phân acid phytic hay phytate tạo thành những gốc phosphate tự do để cung cấp nguồn dinh dưỡng phosphorus thiết yếu cho sinh vật. Trong nhiều nghiên cứu cho thấy chủng nấm mốc *Aspergillus fumigatus* là nguồn sản xuất phytase ngoại bào tiềm năng và ưu điểm nổi bật của phytase từ chủng nấm này là khả năng chịu nhiệt cao, đặc điểm này phù hợp với điều kiện gia nhiệt trong quá trình sản xuất thức ăn chăn nuôi. Vì thế, việc phân lập *A. fumigatus* với khả năng sinh tổng hợp phytase là điều cần thiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có 8 chủng nấm mốc được phân lập từ 5 mẫu lúa khảo sát nhưng chỉ có 3 chủng nấm mốc với ký hiệu ET3, ET7 và ET8 có khả năng sinh tổng hợp phytase cao dựa trên sự hình thành vòng halo trên môi trường tuyển chọn M2 ở nhiệt độ 30°C. Trong đó, chủng ET3 có khả năng phát triển tốt nhất ở nhiệt độ cao (45°C) và các đặc điểm hình thái tương đồng với chủng *A. fumigatus* đã công bố. Định danh chủng ET3 bằng phương pháp sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen trên vùng ITS. Kết quả cho thấy, chủng ET3 thuộc *Aspergillus fumigatus* với mức độ đồng hình 98%.

1 GIỚI THIỆU

Phosphorus là nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho sinh vật bởi vì nó là thành phần cấu trúc quan trọng của nhiều đại phân tử sinh học như DNA, RNA, protein và màng phospholipid của tế bào và các phân tử cao năng lượng như ATP và NADPH

(Jahnke, 2000). Dạng tồn tại chính của phosphorus trong thực vật là phytate (muối của phytic acid). Người và các động vật ăn cỏ dạ dày đơn không thể sử dụng phosphorus ở dạng này vì thiếu enzyme phytase (Holm *et al.*, 2002). Việc bổ sung enzyme phytase vào thức ăn để giúp tiêu hóa tốt phytate là

giải pháp hiệu quả cho các vấn đề trên. Enzyme phytase được tìm thấy ở thực vật, động vật và vi sinh vật. Tuy nhiên, vi sinh vật được xem là nguồn sản xuất phytase chính cho việc nghiên cứu và ứng dụng của enzyme phytase. Nhiều nghiên cứu cho thấy enzyme này có ở vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), nấm men (*Sacharomyces cerevisiae*) và nấm mốc. Trong đó, nấm mốc được xem là nguồn sản xuất phytase dồi dào và phong phú với nhiều loài trong chi *Aspergillus* như *A. ficuum*, *A. carbonarius*, *A. oryzae*, *A. niger*, và *A. fumigatus* (Liu *et al.*, 1999; Shimizu, 1993; Volfova *et al.*, 1994). So với phytase từ các loài khác trong chi *Aspergillus* thì phytase từ *A. fumigatus* có nhiều đặc tính nổi trội hơn như tính đặc hiệu với cơ chất rộng, pH tối ưu thấp ở 2,5 và 5,5, có khả năng hồi tính cao sau khi biến tính ở nhiệt độ cao (Pasamontes *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1998). Với những ưu điểm này, phytase từ *A. fumigatus* được các nhà khoa học chú ý và nghiên cứu trong những năm gần đây. Tuy nhiên, ở Việt Nam có ít tài liệu nghiên cứu về enzyme từ loài nấm mốc này. Do đó, việc phân lập nấm *A. fumigatus* được thực hiện với mong muốn sử dụng có hiệu quả enzyme phytase từ loài nấm mốc này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Các mẫu đất ruộng lúa (500g/mẫu) được thu thập ở các địa điểm khác nhau ở thành phố Cần Thơ, Sóc Trăng và Vĩnh Long.

Bảng 1: Các địa điểm thu mẫu đất lúa

Mẫu	Địa chỉ
1	Phường Thới Hòa, Quận Ô Môn, Thành phố Cần Thơ
2	Phường 5, Thành phố Sóc Trăng
3	Phường 3, Thành phố Sóc Trăng
4	Xã Mỹ Thuận, Huyện Bình Tân, Tỉnh Vĩnh Long
5	Xã Thuận An, Huyện Bình Minh, Tỉnh Vĩnh Long

2.2.2 Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm có khả năng sinh phytase cao và khảo sát khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao

a. Tuyển chọn sơ bộ chủng nấm có khả năng sinh phytase

Lấy 20 g đất/mẫu cho vào cốc thủy tinh và làm nhuyễn, thêm vào 30 mL nước cất để hòa tan mẫu. Để mẫu lắng trong 15 phút. Sau đó dùng micropipet hút 100 μ L phần dịch lỏng trải đều trên đĩa môi trường phân lập nấm mốc M1 (Xiong *et al.*, 2004) có khả năng sinh phytase. Mẫu được ủ trong tủ ủ nhiệt độ ở 30°C trong 3 ngày. Những khuẩn lạc phát triển trên môi trường này được cấy chuyển nhiều lần và quan sát dưới kính hiển vi để

Môi trường chọn lọc nấm mốc sinh phytase M1 (Xiong *et al.*, 2004): 0,1% muối natri phytate (Đức); 0,3% glucose (Đức); 0,5% NH_4NO_3 (Trung Quốc); 0,05% KCl (Đức); 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Trung Quốc); 0,03% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Trung Quốc); 0,03% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Trung Quốc); 1,5% agar (Việt Nam); pH = 5,5.

Môi trường chọn lọc M2 (Hill *et al.*, 2007) để quan sát hoạt tính phytase: 6,4 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Trung Quốc); 8g/L glucose (Đức); 1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L NH_4Cl ; 0,04 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Trung Quốc); 1 mL/L khoáng vi lượng; 4 g/L muối natri phytate (Đức); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,7 g/L (Đức); 5 g/L dịch chiết malt (Đức); 1,5% agar (Việt Nam); pH 7,0.

Môi trường cấy giống và trữ giống (PGA – Potato Glucose Agar): 2% D-glucose (Đức); 1,8%(w/v) agar (Việt Nam); 20%(w/v) khoai tây.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập và trữ mẫu

Các mẫu đất được thu thập trên những ruộng lúa gần thu hoạch và đã thu hoạch ở các địa điểm khác nhau thuộc 3 tỉnh Cần Thơ, Sóc Trăng và Vĩnh Long như Bảng 1.

Phương pháp thu thập và trữ mẫu: Dùng dao lấy lớp đất ruộng lúa với độ sâu khoảng 5-7 cm cho vào túi nylon, ghi chú và đem về trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-8°C, tại phòng Công nghệ Enzyme, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học.

tuyển chọn các chủng thuần trước khi cấy chuyển sang môi trường chọn lọc M2.

b. Tuyển chọn chủng nấm có khả năng sinh phytase cao và khảo sát khả năng sinh trưởng của chúng ở nhiệt độ cao

Các chủng nấm đã lựa chọn được cấy trên môi trường M2 ở 30°C. Trong môi trường M2 có bổ sung phytate như là nguồn phosphorus duy nhất. Vì phytate không tan khi tạo phức với muối canxi clorua nên làm cho môi trường M2 (Hill *et al.*, 2007) có màu trắng đục. Những chủng nấm mốc phát triển trên môi trường này là những chủng có khả năng tổng hợp phytase cao vì khi nấm mốc phát triển sẽ tạo một vòng môi trường trong

suốt bao quanh khuẩn lạc vòng tròn này được gọi là halo.

Để khảo sát khả năng sinh trưởng của các chủng nấm có khả năng sinh phytase cao ở nhiệt độ cao, các chủng nấm mốc có khả năng tạo halo được nuôi cấy trên môi trường M2 ở 45°C.

2.2.3 Nhận diện chủng nấm mốc sinh phytase cao

a. Nhận diện dựa trên đặc điểm hình thái

Các chủng nấm mốc có khả năng sinh phytase cao được nuôi cấy trên môi trường PGA, sau đó được định danh sơ bộ bằng phương pháp quan sát hình thái với các đặc điểm như, dạng bìa, màu sắc, hình dạng và bề mặt của khuẩn lạc. Ngoài ra các mẫu còn được làm tiêu bản xem dưới kính hiển vi để quan sát hệ sợi nấm, dạng bào tử.

Các đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc có khả năng sinh phytase được so sánh với các đặc điểm hình thái của dòng nấm mốc *A. fumigatus* đã được công bố bởi Haines (1995), Fresenius *et al.*, (1863) và Raper để chọn ra chủng tương tự.

b. Nhận diện bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Chủng nấm mốc có khả năng sinh phytase cao ở nhiệt độ cao được định danh bằng các đặc điểm hình thái như trên kết hợp gửi định danh bằng

phương pháp sinh học phân tử ở phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Phương pháp này dựa trên việc giải trình tự vùng gen ITS (internal transcribed spacer). Sau đó trình tự này được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Cập mỗi dùng trong phương pháp này dựa trên cập mỗi của White *et al.* (1990).

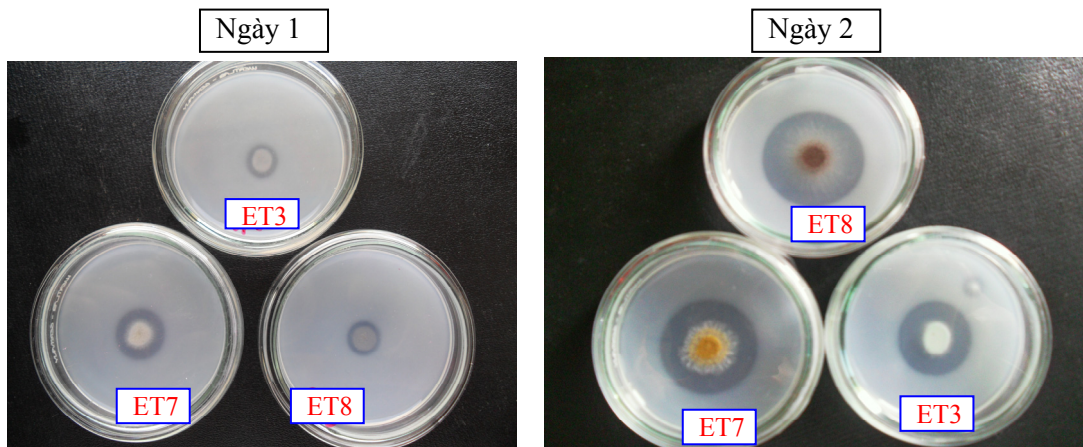
ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập những chủng nấm mốc có khả năng sinh phytase cao và khảo sát khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao

Từ 5 mẫu đất lúa thu thập được, có 8 chủng nấm mốc đã được phân lập trên môi trường phân lập M1 (Xiong, *et al.*, 2004). Trong đó có 3 chủng ET1, ET2, ET3 được phân lập từ mẫu đất số 1 (Cần Thơ), 2 chủng ET4 và ET5 lần lượt được phân lập từ mẫu đất số 4 (Vĩnh Long), chủng ET6 được phân lập từ mẫu đất số 5 (Vĩnh Long) và 2 chủng ET7 và ET8 lần lượt được phân lập từ mẫu đất số 2 và 3 (Sóc Trăng).



Hình 1: Khả năng tạo halo của 3 chủng nấm mốc ET3, ET7, ET8 trên môi trường M2 ở 30°C

Tuy nhiên chỉ có 3 chủng nấm mốc ET3, ET7, ET8 có khả năng tạo halo ở 30°C khi được cấy trên môi trường M2 (Hình 1). Điều này chứng tỏ các chủng này có khả năng sinh phytase cao nhất. Thật sự, môi trường M2 với nồng độ natri phytate khá cao và bị tủa khi gặp muối canxi làm môi trường có màu trắng đục. Khi đó, các chủng nấm mốc với khả năng sinh phytase cao phân cắt muối phytate này để sử dụng nguồn dinh dưỡng phospho cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Vùng môi

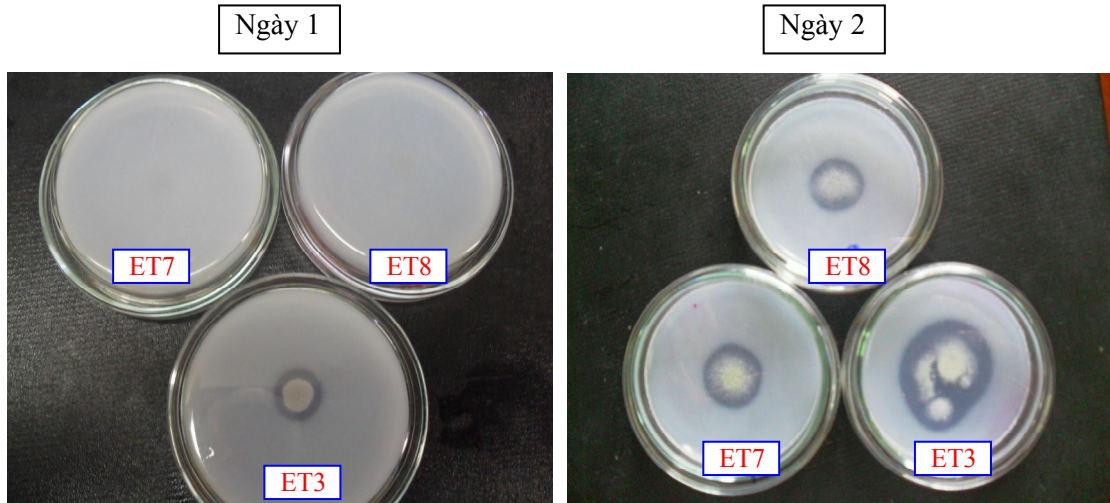
trường xung quanh khuẩn lạc bị phân giải nên có màu trong hơn được gọi là halo.

Theo Haines (1995), *A. fumigatus* có khả năng chịu nhiệt cao, đặc biệt có thể tồn tại ở nhiệt độ 55°C, và có thể đến 70°C; trong khi các loài nấm khác cùng chi *Aspergillus* khó sinh trưởng ở nhiệt độ trên 40°C. Đó là đặc điểm quan trọng để phân biệt loài *A. fumigatus* với các loài nấm khác thuộc chi *Aspergillus* như *A. flavus*,

A. niger, và *A. terreus* (Chang *et al.*, 2004; Cooney and Emerson, 1964; Maheshwari *et al.*, 2000). Vì vậy, 3 chủng nấm mốc này được cấy trên môi trường M2 ở 45°C để đánh giá khả năng phát triển và sinh phytase của chúng.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy chỉ có chủng ET3 là

có khả năng sinh trưởng và tạo halo ở ngày đầu tiên trong khi đó khả năng sinh phytase tạo halo của chủng E7 và E8 bắt đầu ở ngày thứ 2. Như vậy, chủng nấm mốc E3 có thể sinh trưởng nhanh ở nhiệt độ cao (45°C) so với 2 chủng nấm còn lại vì hai dòng nấm còn lại cần nhiều thời gian thích ứng với điều kiện nhiệt độ cao.



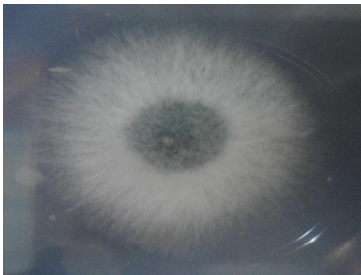
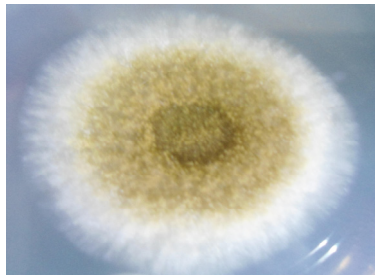
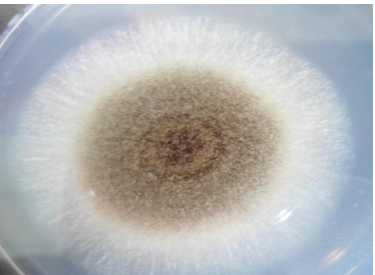
Hình 2: Khả năng tạo halo của 3 dòng nấm mốc ở 45°C

3.2 Nhận diện các chủng nấm mốc đã tuyển chọn

3.2.1 Định loại các chủng nấm mốc đã tuyển chọn dựa trên đặc điểm đại thể của khuẩn lạc

mốc có khả năng tạo halo trên môi trường M2 như trên đã được cấy tiếp tục trên môi trường PGA ở 30°C. Các đặc điểm về hình thái và màu sắc khuẩn lạc của 3 chủng này được trình bày ở Bảng sau.

Để khảo sát về mặt hình thái, ba chủng nấm

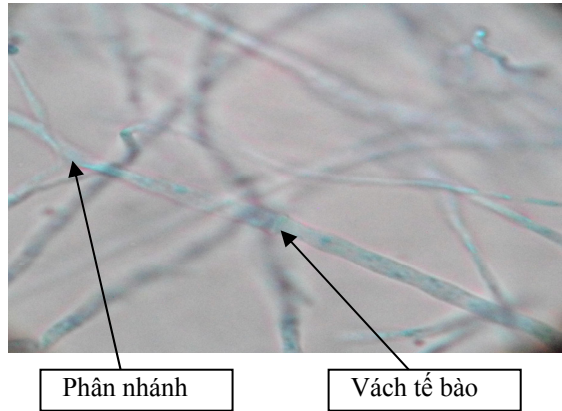
ET3	ET7	ET8
		
<ul style="list-style-type: none"> - Hình dạng: Tròn - Màu sắc: màu xanh rêu ở trung tâm do các khuẩn ty sinh sản phát triển bào tử, phần rìa của khuẩn lạc có màu trắng do sự phát triển của những khuẩn ty dinh dưỡng với các sợi mảnh và trắng. - Bề mặt xốp, ở giữa gồ lên - Không có sắc tố tiết ra môi trường và giọt tiết - Khuẩn lạc phát triển sau 1 ngày cấy và sản sinh bào tử ở ngày thứ 2 	<ul style="list-style-type: none"> - Hình dạng: Tròn - Màu sắc khuẩn lạc: vàng sậm ở giữa do sự phát triển của khuẩn ty sinh sản tạo bào tử, xung quanh có màu trắng bởi sự phát triển của khuẩn ty dinh dưỡng với các sợi mảnh và trắng - Bề mặt xốp, ở giữa gồ lên - Không có sắc tố tiết ra môi trường và giọt tiết - Khuẩn lạc phát triển sau 1 ngày cấy và sản sinh bào tử ở ngày thứ 2 	<ul style="list-style-type: none"> - Hình dạng: Tròn - Màu sắc khuẩn lạc: màu nâu ở trung tâm khuẩn lạc do sự phát triển của khuẩn ty sinh sản, xung quanh có màu trắng do sự phát triển của khuẩn ty dinh dưỡng. - Bề mặt xốp, ở giữa gồ lên - Không có sắc tố tiết ra môi trường và giọt tiết - Khuẩn lạc phát triển sau 1 ngày cấy và sản sinh bào tử ở ngày thứ 2

Với những đặc điểm hình thái và khả năng chịu nhiệt cao của chủng ET3 phù với các đặc điểm của nấm *A. fumigatus* được công bố bởi Haines (1995) và Fresenius *et al.* (1863) nên chủng ET3 được chọn để quan sát dưới kính hiển vi và định danh bằng phương pháp Sinh học phân tử.

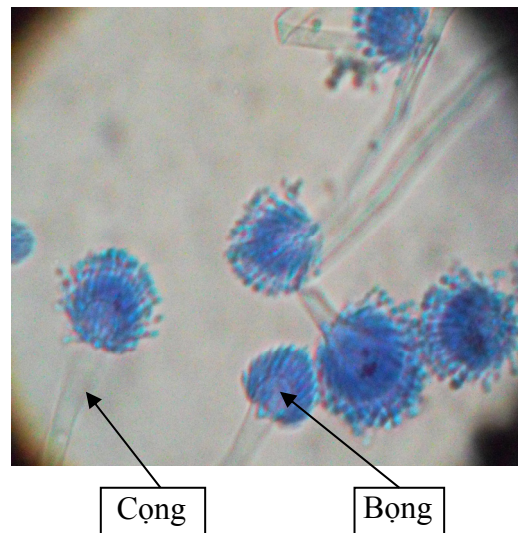
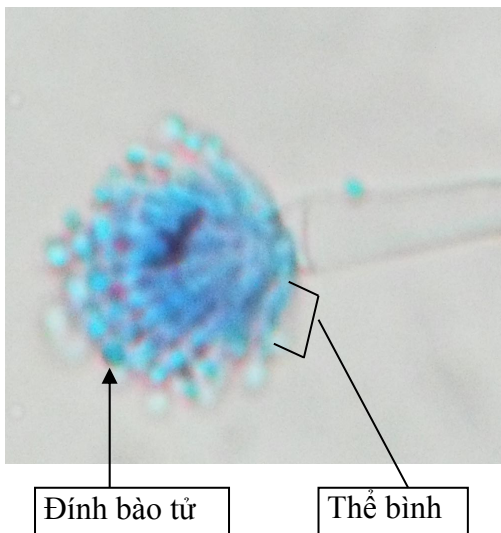
3.2.2 Đặc điểm vi thể của chủng ET3 dưới kính hiển vi quang học

Việc định danh *A. fumigatus* chủ yếu dựa vào hình thái của bào tử đỉnh và cộng mang túi bào tử. Khi quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính E40, khuẩn ty dinh dưỡng của chủng nấm mốc này có vách ngăn hoàn chỉnh và có phân nhánh. Cộng mang túi bào tử của khuẩn ty sinh sản ngắn, không phân nhánh và không màu; phần trên phình to tạo thành bong có cùng màu với cộng mang túi bào tử, bong gắn với nhiều thể bình mang

các đỉnh bào tử. Các đặc điểm trên của chủng nấm mốc này giống như những mô tả của Fresenius và *ctv.* (1863), Raper và Fennell (1965) về chủng nấm mốc *Aspergillus fumigatus*.



Hình 3: Khuẩn ty dinh dưỡng của chủng ET3



Hình 4: Khuẩn ty sinh sản của chủng ET3

3.2.3 Định danh bằng phương pháp phân tử

Chủng nấm mốc ET3 được gửi định danh ở phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Vùng gene ITS của chủng nấm mốc ET3 có tổng số nucleotide được giải là 533 sử dụng bằng cặp mồi của White *et al.*

(1990) (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Kết quả được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này đồng hình 98% với trình tự của loài nấm mốc *A. fumigatus* đã được đăng ký trong Genbank và với giá trị E-value bằng 0 (Hình 5). Như vậy, chủng nấm mốc ET3 là *A. fumigatus*.

>Ket qua giai trình tu vung Its

```
GTGTCATATCGTACATTGTTGCTTCGGCGTCGCCCCCGCTTTGACGGCCGCCGGGGAGGCC
TTGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATG
CAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CATCGTGGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGC
GTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGA
CGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTAC
CTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCGACTTTATTTTTCTAAGGTTGACC
TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAACGGGAGGA
```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF669931.1	Aspergillus fumigatus isolate NRRL 163 18S ribosomal RNA g	933	933	100%	0.0	98%
EF669932.1	Aspergillus fumigatus isolate NRRL 164 18S ribosomal RNA g	933	933	100%	0.0	98%
AB369897.1	Aspergillus fumigatus genes for small subunit rRNA, ITS1, 5	933	933	100%	0.0	98%
EF134624.1	Aspergillus fumigatus strain EMC1 18S ribosomal RNA gene,	933	933	100%	0.0	98%
DQ981399.1	Aspergillus fumigatus 18S ribosomal RNA gene, partial seque	933	933	100%	0.0	98%
DQ901009.1	Aspergillus fumigatus internal transcribed spacer 1, partial s	933	933	100%	0.0	98%
DQ837535.1	Aspergillus fumigatus P-1007 internal transcribed spacer 1,	933	933	100%	0.0	98%
DQ459328.1	Aspergillus fumigatus strain Th003 18S ribosomal RNA gene,	933	933	100%	0.0	98%
AY373851.1	Aspergillus fumigatus strain SRRC 43 18S ribosomal RNA ger	933	933	100%	0.0	98%
AY214446.1	Aspergillus fumigatus strain ATCC 16907 18S ribosomal RNA	933	933	100%	0.0	98%

Hình 5: Kết quả định danh dòng nấm mốc ET3 dựa vào trình tự ITS

4 KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất lúa được thu thập ở Cần Thơ, Sóc Trăng và Vĩnh Long, các chủng nấm mốc ET3, ET7 và ET8 có khả năng sinh phytase cao trên môi trường M2 đã được phân lập. Cả 3 chủng trên đều có khả năng sinh trưởng ở 45°C, tuy nhiên chủng ET3 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt nhất. Qua kết quả nhận diện bằng đặc điểm hình thái đại thể của khuẩn lạc, cũng như đặc điểm vi thể và phương pháp sinh học phân tử ET3 được định danh là chủng *Aspergillus fumigatus*. Với khả năng sinh phytase cao, chủng nấm mốc này sẽ là nguồn sinh phytase ngoại bào tốt để làm tăng hiệu quả kinh tế khi ứng dụng bổ sung vào nguồn thức ăn cho gia súc và gia cầm.

LỜI CẢM Ạ

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Viện Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện cơ sở, vật chất thuận lợi cho sự thành công của nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang, Y.C., H.F. Tsai, M. Karos, and K.J. Kwon-Chung. 2004. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, 41: 888-896.
- Cooney, D.G., and R. Emerson. 1964. *Thermophilic Fungi*. An Account of their Biology, Activities and Classification. W.H. Freeman, San Francisco, CA.

- Fresenius, G. 1863. *Beitrag zur Mykology*. Frankfurt a.M., Bronner, pp 81-82.
- Haines, J. 1995. *Aspergillus* in compost:straw man or fatal flaw. *Biocycle*, 6:32-35.
- Holm, P.B., K. N. Kristiansen and H. B. Pedersen. 2002. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *Journal of Nutrition*, 132(3): 514S-516S.
- Jahnke, R. A. 2000. The Phosphorus Cycle. In R. C. Michael Jacobson. *Earth System Science*, pp. 360-376.
- Liu, BL, C.H. Jong and Y.M. Tzeng. 1999. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. *Enzyme Micro Technol*, 25: 517-521
- Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M. K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 461-488.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier and A.P.G.M. Loon. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1696-1700.
- Raper, K.B, D.I Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins,

11. Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotech Biochem*, 57(8): 1364-1365.
12. Volfova, O., J. Dcorakova, A. Hanzlikova and A. Jandera. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol*, 39(6): 481-484.
13. White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (năm) PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press. p315-322.
14. Wyss, M., L. Pasamontes, A. Friedlein. 1998. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4446-4451.
15. Xiong, A.S., H.Q. Yao, R.H. Peng, X. Li, Q.H. Fan, M.J. Guo and S.L. Zhang. 2004. Isolation, characterization, molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 282-291.