

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT  
CÓ KHẢ NĂNG THỦY PHÂN LÔNG VŨ GIA CẦM VÀ  
THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN KERATINASE TRONG *ESCHERICHIA COLI***

**NGUYỄN THỊ MINH**

*Trường THPT Diêm Thụy, Phú Bình, Thái Nguyên*

**NGUYỄN THỊ THU HIỀN, NGUYỄN HUY HOÀNG**

*Viện Công nghệ Sinh học*

Keratin là một hợp chất sừng, chiếm tỷ lệ khoảng 90-95% trong lông vũ gia cầm, có bản chất là protein rất ít hòa tan trong nước và khó bị phân hủy với các tác nhân lý, hóa, nhưng các chất thải keratin có thể bị phân hủy bởi các chủng vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm có khả năng sinh tổng hợp men keratinase. Hiện nay, nguồn lông vũ phế thải từ các nhà máy chế biến gia cầm đang được tận dụng để sản xuất bột lông vũ thông qua quá trình xử lý nhiệt. Tuy nhiên, sản phẩm tạo ra chất lượng dinh dưỡng thấp (Wang, Sih, 1997) làm phá hủy một số axit amin nhất định, làm giảm khả năng tiêu hóa và chất lượng protein (Riffel, Brandelli, 2006). Tại Việt Nam, ngành công nghiệp dùng nguồn phế thải làm phân bón và thức ăn chăn nuôi đang rất phát triển, sử dụng phổ biến phương pháp xử lý phế thải này bằng kiềm hoặc axit với nhiều hạn chế (giá thành cao, hiệu suất thấp...). Do vậy, việc ứng dụng enzyme từ vi khuẩn để xử lý có nhiều ưu điểm hơn như tạo sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, giá thành thấp và thân thiện với môi trường. Nguồn enzyme để thủy phân da, lông, móng... trong nước chủ yếu là nhập ngoại, nên việc nghiên cứu enzyme từ vi khuẩn để thủy phân lông vũ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Đến nay, các keratinase được nghiên cứu chủ yếu có nguồn gốc từ vi sinh vật khác nhau như *Streptomyces*, *Vibrio*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* và *Bacillus*. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng thủy phân lông vũ và phân lập gen keratinase, chọn dòng trong vector pET 32a để biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli*.

**I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Các mẫu đất và lông vũ được thu thập từ các tỉnh Thái Nguyên, Nam Định, Hưng Yên, Hà Tây (Hà Nội). Sử dụng chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, chủng *Bacillus* sp. L.Nd 3.4, *Bacillus* sp. Đ.NĐ 1.2. và vector biểu hiện pET 32a trong nghiên cứu này. Các hóa chất thông dụng là sản phẩm của các hãng Sigma (Mỹ); Peking (Trung Quốc); Kanto (Nhật Bản); Merk/BHD Chemical (Đức)...

Lông vũ được nhúng vào môi trường Broth Peptone trong 24 giờ. Sau đó dịch được trải trên các môi trường để phân lập chủng vi sinh vật (Brandelli, Riffel, 2005) [1]. Các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus*, *Vibrio* và *Chryseobacterium* được tiến hành theo phương pháp đã công bố (Brandelli, Riffel, 2005; Sangali, Brandelli, 2000; Riffel, Brandelli, 2002) [1, 12].

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi lắc 200 v/p ở 30°C trong 50 ml môi trường có thành phần (g/l): NaCl 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; pH 7,0-7,2 có bổ sung: 0,2 g lông vũ. Cân lượng lông vũ còn lại trong môi trường sau 3-5 ngày nuôi để tính trọng lượng lông vũ đã được thủy phân tính theo công thức:

$$A(\%) = \frac{m_{BD} - m_C}{m_{BD}} \times 100\%$$

A(%): Tỷ lệ phần trăm thủy phân của các chủng.

m<sub>BD</sub>: Trọng lượng lông vũ ban đầu.

m<sub>C</sub>: Trọng lượng lông vũ sau thời gian nuôi lắc.

Các chủng vi khuẩn có khả năng thủy phân lông vũ tốt nhất đã được chọn lọc để nhân giống cấp 1, rồi cấy 1% giống cấp 1 vào các môi trường gồm: Môi trường giàu dinh dưỡng (môi trường MPA) (tính g/l): NaCl 5; Peptone 10; Cao thịt 3; pH 7,2; Môi trường dinh dưỡng bình thường (môi trường khoáng): NaCl 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; pH 7,2; Môi trường nghèo dinh dưỡng: môi trường nước. Nuôi lác 200 v/p, ở nhiệt độ 30-35°C trong 3-5 ngày. Đánh giá, lựa chọn môi trường phù hợp cho các chủng vi khuẩn sinh keratinase.

Các chủng được thử trên các khung nhiệt độ 25°C, 30°C, 35°C và 40°C để tìm ra nhiệt độ thích hợp, kết hợp với đo pH. Cân khối lượng lông còn lại của từng chủng trên các nhiệt độ sau 4 ngày nuôi cấy để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên khả năng sinh trưởng của vi khuẩn thủy phân lông vũ

Các khuẩn lạc được quan sát trên môi trường thạch, xác định đặc điểm hình thái bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 40x và 100x. Nhuộm Gram. Phân loại chủng bằng phương pháp sinh hóa, sử dụng bộ Kit chuẩn API 50CHB và API 20NE (Boimereux, Pháp).

Tách DNA tổng số theo Masterson và cs. (Masterson R. V. *et al.*, 1985). Phân lập đoạn gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 16SF: 5'-CGGAATTCATTGCTGGACCTG-3' và 16SR: 5'-CCTAGAGCTTTGTCTTTAGG-3' (Hiền và cs., 2010). Trình tự đích được xác định trên máy đọc trình tự gen ABI PRISM 3100 Avant. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm Bioedit.

### **Thiết kế vector biểu hiện**

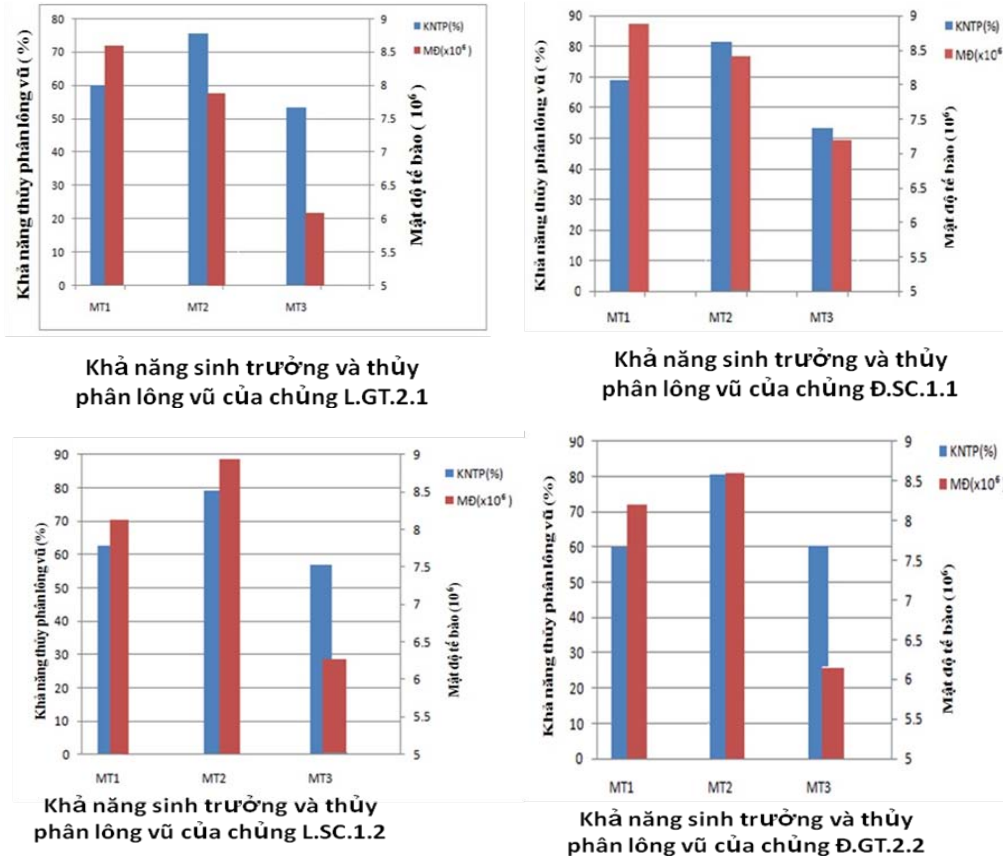
Trình tự mồi đặc hiệu để nhân bản đoạn gen Ker được thiết kế dựa vào gen tương đồng của chủng *B. subtilis* trong Ngân hàng Genbank. Mồi được gắn thêm trình tự nhận biết của các enzyme giới hạn *XhoI* trên mồi xuôi KeF: 5'-CGT GGGATCCAAAAAATTGTGGATCAGC-3' và *BamHI* trên mồi ngược KeR: 5'-TTATTCTCGAGCTGCTTGTACGT TGAT-3' (vị trí gạch chân) để tiến hành chọn dòng vào vector biểu hiện pET 32c. Chu trình nhiệt PCR để nhân đoạn gen keratinase: 95°C: 3 phút; 30 chu trình: 95°C: 1 phút, 60°C: 1 phút, 72°C: 3 phút; 72°C: 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Kit GeneJET™ Gel Extration (Fermentas).

Sản phẩm PCR và vector pET 32a được xử lý bằng 2 enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *BamHI*, sản phẩm sau cắt được thổi gel và tinh sạch bằng bộ kit GeneJET™ Gel Extration của Fermentas và được gắn vào vector pET 32a bằng enzyme T4 DNA ligase, phản ứng được tiến hành ở 16°C trong 5 giờ, sản phẩm ligase được biến nạp vào tế bào khả biến DH10B bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút và trải trên đĩa LB có bổ sung kháng sinh Ampicilin. Kết quả biến nạp được kiểm tra bằng phương pháp tách plasmid rồi xử lý bằng 2 enzyme *XhoI* và *BamHI*. Sản phẩm vector biểu hiện pET32C-Ker sau khi đã kiểm tra được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21. Tách plasmid từ chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp để kiểm tra kết quả biến nạp.

## **II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

Đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn, trong đó 6 chủng có hoạt tính thủy phân lông vũ cao từ 72,3% đến 81,55%, 3 chủng không có hoạt tính, còn lại 11 chủng có tỷ lệ thủy phân trung bình khoảng 50-60%. Mức độ thủy phân của các chủng là rất khác nhau theo từng ngày nuôi cấy và khả năng thủy phân của các chủng đạt cao nhất vào ngày thứ 4. Có 4 chủng phân hủy keratin mạnh nhất là: Đ.GT.2.2 (80,45 %); L.SC.1.2 (79,25 %); L.GT.2.1 (75,45 %) và Đ.SC.1.1 (81,55 %). Phương pháp đánh giá khả năng thủy phân lông vũ sử dụng cơ chất Azokeratin, tuy chính xác hơn, nhưng ổn công, giá thành rất cao (Lin X *et al.*, 1992; Quyên, Phương, 2001; Gupta, Ramnani, 2006; Brandelli *et al.*, 2009) [2, 5] so với phương pháp mới của chúng tôi.

4 chủng phân hủy keratin mạnh nhất trên nuôi trong 3 môi trường khác nhau (môi trường giàu dinh dưỡng - MT1, môi trường khoáng - MT2, môi trường nghèo dinh dưỡng - MT3) cho thấy sự khác biệt rõ rệt về sự sinh trưởng, mật độ tế bào cũng như khả năng thủy phân lông vũ của chúng (Hình 1).



Hình 1: Khả năng sinh trưởng và thủy phân lông vũ của các chủng vi khuẩn trên các môi trường khác nhau

Cả 4 chủng chọn lọc nuôi trong môi trường giàu dinh dưỡng (MT1) đều sinh trưởng tốt, mật độ tế bào cao khoảng  $\geq 7.10^6$  CFU/ml, nhưng khả năng thủy phân lông vũ lại không cao, chỉ đạt 59 - 69. Ở môi trường nghèo dinh dưỡng, khả năng thủy phân lông vũ thể hiện không rõ ràng. Ở môi trường khoáng (MT2), khả năng thủy phân lông vũ đạt từ 75 - 81%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác khi sử dụng môi trường khoáng có bổ sung bột lông vũ nuôi cấy chủng vi khuẩn *Flavobacterium* (Riffel, Brandelli, 2002), *Vibrio* (Sangali, Brandelli, 2000), *Chryseobacterium* (Nguyễn Thu Hiền và cs., 2010) với mục đích thu hồi keratinase. Vì vậy, môi trường khoáng (MT2) là môi trường thích hợp cho các chủng vi khuẩn thủy phân lông vũ.

Nuôi cấy 4 chủng chọn lọc được trong khung nhiệt độ 25°C, 30°C, 35°C và 40°C cho thấy các chủng này phát triển tốt và sinh keratinase cao ở khoảng nhiệt độ từ 35-40°C, lượng tế bào đạt từ 7,83 - 8,90 x 10<sup>6</sup> CFU và trọng lượng lông thủy phân đạt từ 0,1854 - 0,5607 (Bảng 1), tỷ lệ thủy phân đạt khoảng 73,69% - 81,46%. So sánh với kết quả của một số nghiên cứu trước đây, nhận thấy rằng phần lớn các chủng thuộc nhóm *Bacillus* đều sinh trưởng và sinh enzyme keratinase cao ở điều kiện nhiệt độ khoảng 30 -50°C (Gupta, Ramnani, 2006; Korkmaz *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2007).

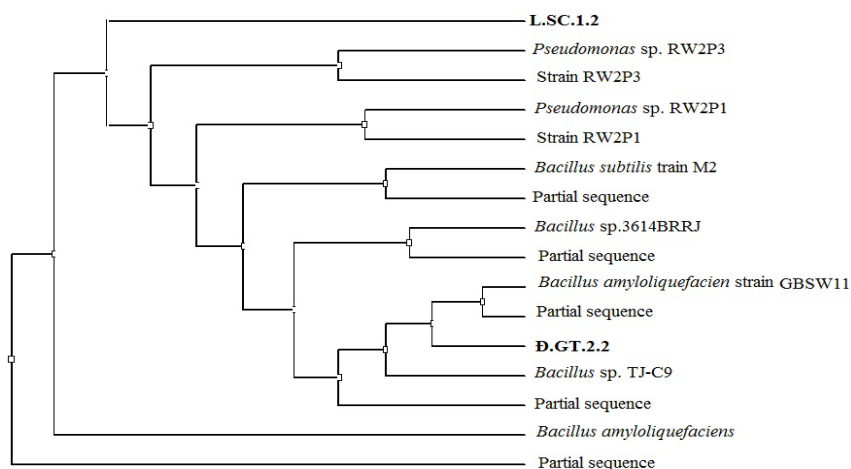
Bảng 1

Mật độ tế bào và khả năng thủy phân 1 g lông vũ sau 4 ngày nuôi lắc

Chủng	L.SC.1.2		Đ.SC.1.1		L.GT.2.1		Đ.GT.2.2	
	A (x10 <sup>6</sup> )	B	A (x10 <sup>6</sup> )	B	A (x10 <sup>6</sup> )	B	A (x10 <sup>6</sup> )	B
25°C	5,97	0,4510 ± 0,06	6,34	0,4217 ± 0,08	6,36	0,4356 ± 0,09	6,78	0,4123 ± 0,14
30°C	6,13	0,5021 ± 0,10	7,32	0,4154 ± 0,12	7,28	0,4076 ± 0,11	7,30	0,4012 ± 0,09
35°C	7,12	0,5607 ± 0,07	7,83	0,4110 ± 0,08	8,07	0,2631 ± 0,08	8,53	0,1854 ± 0,11
40°C	7,20	0,5202 ± 0,07	8,21	0,4374 ± 0,08	8,34	0,3450 ± 0,14	8,90	0,1990 ± 0,11

Ghi chú: **A:** Số lượng vi khuẩn (CFU/ml) x 10<sup>6</sup>; **B:** Lượng lông vũ đã sử dụng (g).

Chủng Đ.GT.2.2 có hình que lớn, dài mảnh, đơn, ghép đôi, hoặc tạo chuỗi, thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (G<sup>+</sup>), được phân loại bằng kit API 50CHB. Chủng L.SC.1.2 có hình dạng trực khuẩn ngắn, chuyển động, thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm (G<sup>-</sup>) được phân loại bằng kit API 20NE. Kết quả xác định phản ứng hoá sinh đối với chủng Đ.GT.2.2, được so sánh với Bảng thống kê quốc tế Analytical Profile Index, 5<sup>th</sup> edition, BioMerieux S.A, 1992, tương đồng đến 78,3% so với loài *Bacillus licheniformis*. Còn chủng L.SC.1.2 tương đồng tới 89,4% so với loài *Pseudomonas pertida*.



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại của 2 chủng L.SC.1.2 và Đ.GT.2.2

Đã xác định đoạn gen có kích thước 1390 bp đối với chủng L.SC.1.2 và 1110 bp chủng Đ.GT.2.2. Hai đoạn gen này có độ tương đồng từ 95 - 98% với nhiều loài thuộc chi *Bacillus* và chi *Pseudomonas*, phù hợp với kết quả phân loại hóa sinh. Cây phát sinh chủng loại (Hình 2) cho thấy vị trí của 2 chủng vi khuẩn này so với một số chủng được công bố trước đây.

Đoạn gen Ker đã được nhân bản thành công bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu KeF và KeR. Do khả năng thủy phân lông vũ của hai chủng Đ.GT.2.2 và L.SC.1.1 không tốt bằng 2 chủng *Bacillus* sp. L.Nđ 3.4; *Bacillus* sp. Đ.NĐ 1.2 (Phòng Vi sinh vật Đất – Viện Công nghệ Sinh học đã phân lập). Vì thế, gen Ker này đã được lựa chọn để tiến hành tách dòng và thiết kế vector biểu hiện.

Đoạn gen Ker và vector pET 32a sau khi được xử lý bằng 2 enzyme *XhoI* và *BamHI* được ligase rồi biến nạp thành công vào tế bào khả biến *E.coli* DH10B. Plasmid tái tổ hợp mang gen Ker sẽ được đưa vào biểu hiện ở vi khuẩn *E.coli* BL21.

### III. KẾT LUẬN

Đã phân lập và tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn: L.SC.1.2; Đ.SC.1.1; L.GT.2.1; Đ.GT.2.2 có khả năng sinh keratinase cao đạt từ 75,45 đến 81,55 %. Môi trường và nhiệt độ thích hợp cho các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn là môi trường dinh dưỡng khoáng - MT2 và nhiệt độ nuôi cấy khoảng từ 35-40°C.

2 chủng Đ.GT.2.2 và L.SC.1.2 có độ tương đồng cao về trình tự đoạn gen 16S rRNA so với các chủng *Bacillus licheniformis* (98%) và *Pseudomonas pertida* (95%) và phù hợp với kết quả định loại bằng phương pháp kit chuẩn sinh hóa.

Đã thiết kế được vector tái tổ hợp pET32a mang đoạn gen mã hóa enzyme keratinase để tiến hành biểu hiện trong *Escherichia coli*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brandelli A., 2005: *J. Biotechnol*, pp. 35-37.
2. Brandelli A., D.J. Daroit, A. Riffel, 2009: *Appl Biochem Biotechnol*, 85: 1735-1750.
3. Godde C., K. Sahm, S.J.J. Brouns, L.D. Kluskens, J. van der Oost, W.M. de Vos, G. Antranikian, 2005: *Appl. Environ. Microbiol*, 71: 3951-3958.
4. Joo H.S., C.G. Kumar, G.C. Park, K.T. Kim, S.R. Paik, C.S. Chang, 2002: *Process Biochemistry*, 38(2): 155-159.
5. Lin X., C.G. Lee, E.S. Casale, J.C.H. Shih., 1992: *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3271-3275.
6. Nguyễn Huy Hoàng, Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, 2010: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(4):1869-1875.
7. Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Huy Hoàng, 2010: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8(3A): 923-928.
8. Nguyễn Văn Sứ, 2000: Vai trò của vi sinh vật đất trong hệ thống nông nghiệp bền vững. Tài nguyên vi sinh vật đất và sự phát triển bền vững của hệ sinh thái đất. NXB. Nông nghiệp.
9. Palleroni N.J., 1984: Genus *bacillus*. The Williams and Wilkin Co., Baltimore.
10. Radha S., P. Gunasekaran, 2007: *Journal application microbial*, 103: 1301-1310.
11. Radha S., P. Gunasekaran, 2009: Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains, *Protein Expression and Purification*, 64: 24-31.
12. Sangali S., A. Brandelli, 2000: *J Appl Microbiol*, 89: 735-743.
13. Shih J.C.H., 1993: *Poultry Science*, 72: 1617-1620.
14. Tamilmani P., A. Umamaheswari, A. Vinayagam, 2008: *Prakash International Journal of Poultry Science*, 7(2): 184-188.
15. Zhang B., Z. Sun, D. Jiang, T.G. Niu, 2009: *African Journal of Biotechnology*, 8(11): 2598-2603.

**Lời cảm ơn:** Công trình này nhận được sự tài trợ kinh phí từ đề tài cơ sở của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi để thực hiện đề tài này.

**ISOLATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS CAPABLE OF  
HYDROLYZING FEATHER AND DESIGN OF VECTOR TABLE  
KERATINASE IN *ESCHERICHIA COLI***

**NGUYEN THI MINH, NGUYEN THI THU HIEN, NGUYEN HUY HOANG**

**SUMMARY**

Keratinase is one of protease enzymes, utilized to degradade keratin of hair, claws, horns and epiderma of human and animals. It appears in numerous microorganisms, especially in bacteria. We isolated and characterized the strains which is produced keratinase from the farm and the abattoir. The optimal conditions was identified at temperature of 35°C to 40°C and the capacity of feather degradation reached 75.45% to 81.55% after 4 days of incubation. Two strains Đ.GT.2.2 and L.SC.1.2 is classified base on morphology, biochemistry tests (API 50CHB và 20NE kits) and 16S rARN sequence. Đ.GT.2.2 and L.SC.1.2 strains showed 98% and 95% homology when comparing with *Bacillus* and *Pseudomonas*, respectively. Simultaneously, the keratinase gene (Ker) was cloned and pET32a recombination vector which contains Ker, was designed to express in *Escherichia coli*.