

# TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN PHÂN HỦY LÔNG GIA CẦM

Đào Thị Hồng Vân<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hiếu<sup>2</sup>

## TÓM TẮT

Sử dụng vi sinh vật có hoạt tính keratinaza đang được ưu tiên trong xử lý lông vũ vì đem lại hiệu quả cao, sản phẩm tạo thành được ứng dụng làm thức ăn chăn nuôi, làm phân bón phục vụ cho nông nghiệp. Từ 150 chủng vi khuẩn đã chọn được 5 chủng vi khuẩn có hoạt tính keratinaza cao, trong đó chủng vi khuẩn BS18 có khả năng phân hủy lông gà mạnh nhất. Nghiên cứu phân loại dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá và trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng BS18 có mức độ tương đồng cao (99%) với các vi khuẩn *Bacillus cereus*. Đã nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân hủy lông gà của chủng BS18 cho kết quả tốt nhất ở môi trường MP, nồng độ lông gà 10 g.L<sup>-1</sup>, khi nuôi lác 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày với mức độ phân hủy lông gà đạt 93,5%.

Từ khóa: *Keratinaza, keratin từ lông vũ, Bacillus, Bacillus cereus*.

## 1. BẬT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, mỗi năm tiêu thụ khoảng 2,7 tỷ con gà và có khoảng 8,4 tỷ tấn lông vũ được thải ra từ ngành công nghiệp chế biến gia cầm. Protein chủ yếu trong lông vũ cũng như trong da, sừng, tóc, móng chủ yếu là keratin. Lông vũ có hàm lượng keratin rất cao, chiếm gần 90% khối lượng [1, 12, 13, 14]. Do vậy, nếu không xử lý triệt để lượng rác thải sinh ra từ lông vũ có thể dẫn tới các nguy cơ ô nhiễm cao tại các nơi chế biến. Phương pháp ứng dụng phổ biến để xử lý lông vũ hiện nay là phương pháp hóa học: nếu sử dụng NaOH để thủy phân dẫn tới dịch thủy phân có tính kiềm cao, sử dụng axit đậm đặc HCl 37% cần kết hợp đun ở nhiệt độ cao 100°C, các yếu tố trên có thể dẫn đến biến tính các axit amin có trong dịch thủy phân, làm giảm giá trị. Như vậy, những phương pháp hóa học đều có giá thành cao, hiệu suất thấp và còn phá hủy một lượng lớn axit amin trong đó, ngoài ra sử dụng NaOH và HCl còn thải ra các chất ô nhiễm thứ cấp [1]. Hiện nay, sử dụng vi sinh vật có hoạt tính keratinaza đang được ưu tiên ứng dụng xử lý lông vũ vì đem lại hiệu quả cao và khắc phục được các hạn chế của các phương pháp cũ [5].

Keratinaza có thể được sinh ra bởi nhiều nhóm vi sinh vật như vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn và được ứng dụng trong các quá trình thủy phân lông gà để tạo thành các hợp chất giàu dinh dưỡng bổ sung vào thức ăn gia súc, làm phân bón hữu cơ. Trên thế giới, nhiều tác giả đã sử dụng các chủng vi sinh vật có

hoạt tính keratinaza cao trong phân hủy lông gà như *Alternaria* sp., *Aspergillus nidulan*, *Streptomyces* spp, *Bacillus* sp. [1, 3, 7, 9, 12, 13, 14]. Ở nước ta, đã có những nghiên cứu thu nhận keratinaza từ vi sinh vật để ứng dụng trong thủy phân lông gà, trong công nghiệp da và chất tẩy rửa; các loài vi sinh vật được sử dụng trong thu nhận keratinaza bao gồm: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Chryseobacterium* sp. [3]. Trong nghiên cứu này, trình bày một số kết quả của quá trình phân hủy keratin có trong lông gà bởi chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn nhận được từ bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ sinh học và Viện Đại học Mở Hà Nội. Lông gà được thu thập từ ngoài chợ Đại Mỗ (Từ Liêm, Hà Nội). Hóa chất chất Merk, Sigma...

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### a. Tạo cơ chất

Lông gà sau khi thu thập từ chợ Đại Mỗ về phòng thí nghiệm, được rửa lại 3 lần bằng nước máy và sấy ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi, bảo quản ở nhiệt độ thường để sử dụng làm cơ chất.

Tạo cơ chất azokeratin có thể được tổng hợp dựa theo phương pháp Charney và cộng sự, 1947 [2]: Cân 15 g lông gà đã rửa sạch, nghiền mịn, bổ sung 500 ml nước và 100 ml dung dịch NaHCO<sub>3</sub> nồng độ 100 g.L<sup>-1</sup>. Khuấy đều hỗn hợp, bổ sung thêm 200 ml NaOH nồng độ 0,12 M có chứa 8,65 g axit sulfanilic và 1,7 g NaNO<sub>2</sub>. Dung dịch được khuấy đều, sau đó tiếp tục

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ Sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

bổ sung 10 ml dung dịch HCl nồng độ 5,0 M, giữ hỗn hợp trong 20 phút và thêm 10 ml dung dịch NaOH 5,0 M. Khuấy đều dung dịch đến khi keratin tạo thành dạng huyền phù, sau đó rửa với nước cất ở 4°C. Thu kết tủa, làm khô trong chân không và bổ sung vào môi trường với lượng 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

*b. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gà*

Các chủng vi khuẩn nhận từ bộ sưu tập giống sau quá trình hoạt hóa, cấy chấm điểm trên môi trường LB có chứa azokeratin, nuôi 30°C sau 72 giờ đánh giá khả năng phân hủy căn cứ vào vòng phân giải.

Trên môi trường LB lỏng bổ sung cơ chất là lông gà với khối lượng 5 g.L<sup>-1</sup>, sau khi khử trùng bổ sung giống với tỉ lệ 5%, nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày, đánh giá khả năng phân hủy thông qua xác định khối lượng lông gà còn lại sau lên men.

*c. Xác định khả năng sinh một số enzym*

Các chủng vi khuẩn cấy chấm điểm trên môi trường khoáng cơ bản 1 có bổ sung các cơ chất như: tinh bột tan, casein, kitin và cacboxymetila xenluloza (CMC). Sau 48 giờ, nuôi ở nhiệt 30°C, xác định hoạt tính enzym ngoại bào bằng cách sử dụng các dung dịch thuốc thử tương ứng: Lugol 1% với môi trường chứa tinh bột và CMC; trichloroaxetic axit 5% với môi trường chứa casein; Congo đỏ 1,0% với môi trường chứa kitin.

*d. Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh học và phân tích trình tự 16S rDNA*

Nghiên cứu đặc điểm sinh học dựa theo khóa phân loại Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1989) [11]. ADN tổng số của vi khuẩn được tách theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [10]. Gien 16S rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi GR1: 5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' và GF1: 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3'. Phản ứng PCR được thực hiện trong hỗn hợp bao gồm: ADN 1,0 µl, Taq polymeraza 0,2 µl, mồi GF1 (10 pmol/µl) 1,0 µl; mồi GR1 (10 pmol/µl) 1,0 µl; đệm cho phản ứng (10X) 2,0 µl, dung dịch MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 0,6 µl, hỗn hợp các deoxyribonucleotit triphosphat (10 mM) 0,4 µl; nước cất đã loại ion 13,8 µl; tổng thể tích 20 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C, 5 phút; 94°C, 90 giây; 59°C, 60 giây; 72°C, 90 giây (30 chu

trình từ bước 2 đến bước 4); 72°C, 10 phút; 4°C, bảo quản mẫu. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%. Kích thước của các đoạn ADN thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang AND chuẩn (Fermentas). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (USA), so sánh với trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank và lập cây phân loại với phần mềm CLC DNA Workbench.

*e. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng phân hủy lông gà của chủng vi khuẩn BS18*

Chủng vi khuẩn BS18 sau khi nhân giống trên môi trường LB ở nhiệt độ 30°C, sau 18 giờ sẽ được bổ sung với tỉ lệ 5% vào môi trường nhằm đánh giá ảnh hưởng một số yếu tố: môi trường MP, Gauze II; ảnh hưởng nồng độ nồng gà lần lượt 5, 10, 15, 20 g.L<sup>-1</sup> và ảnh hưởng điều kiện nuôi tĩnh và lắc 180 vòng/phút.

*f. Tính hiệu suất phân hủy lông gà*

Hiệu suất phân hủy = lượng lông gà mất đi (đã bị phân hủy) (g) sau quá trình xử lý / lượng lông gà ban đầu (g) khi đưa vào xử lý x 100 (%).

### **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy lông gà**

Từ 150 chủng vi khuẩn nhận được từ bộ sưu tập giống, sau khi kiểm tra hoạt tính keratinaza trên môi trường LB aga có chứa azokeratin, đã chọn được 5 chủng có hoạt tính keratinaza cao. Đánh giá khả năng ứng dụng thực tế của 5 chủng vi khuẩn thông qua khả năng phân hủy lông gà có trong môi trường LB lỏng; kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả thể hiện ở bảng 1 cho thấy, trong năm chủng vi sinh vật nghiên cứu thì có bốn chủng có khả năng phân hủy lông gà, bao gồm chủng BS18; BS111, PS1.7 và BS15. Trong đó, chủng BS18 có khả năng phân hủy lông gà mạnh nhất, sau 5 ngày xử lý các sợi lông gà bị phân hủy hoàn toàn tạo thành các mảnh có kích thước nhỏ và hòa lẫn vào trong dịch xử lý. Tuy nhiên mức độ phân hủy lông gà của chủng BS18 vẫn thấp hơn so với chủng *Bacillus* sp. SH15 được phân lập từ trang trại nuôi gà với khả năng phân hủy lông gà hoàn toàn sau 40 giờ ở nhiệt độ 40°C tốc độ lắc tương tự 180 vòng/phút [8]. Tuy vậy, trong số 5 chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gà, chủng BS18 là chủng có nhiều tiềm năng, do vậy đã

được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Với mục đích ứng dụng trong phân hủy lông gà tạo thành các hợp chất giàu dinh dưỡng có thể sử dụng làm phân bón vi sinh hay thức ăn chăn nuôi, việc định tên, mô tả các đặc điểm sinh học các chủng sử

dụng là một yêu cầu bắt buộc, nhằm đánh giá mức độ an toàn về chủng và các sản phẩm trong quá trình chuyển hóa có thể sinh ra trước khi sử dụng. Do đó đặc điểm sinh học của chủng BS18 đã được nghiên cứu.

**Bảng 1. Khả năng phân hủy lông gà của 5 chủng vi khuẩn khi nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C theo thời gian**

Thời gian (ngày) Kí hiệu	Đánh giá về mặt cảm quan		
	1	3	5
BS18	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà bắt đầu phân hủy nhưng diễn ra với tốc độ chậm. Các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ.	Lông gà phân hủy mạnh, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ và mùn ra.
BW1	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà chưa phân hủy nhiều, các cánh lông vẫn còn nhiều.
BS15	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà bắt đầu phân hủy nhưng diễn ra với tốc độ chậm.	Quá trình phân hủy lông gà bắt đầu diễn ra với tốc độ chậm. Một phần các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ chưa mùn hoàn toàn.
PS1.7	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà bắt đầu phân hủy nhưng khá chậm.	Quá trình phân hủy lông gà bắt đầu diễn ra với tốc độ chậm.
BS111	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà bắt đầu phân hủy nhưng diễn ra với tốc độ chậm.	Các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ, tuy nhiên không mùn hoàn toàn.

### 3.2. Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn BS18

Chủng BS18 thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), tế bào hình que, đứng xếp đôi và đơn (Hình 2), khuẩn lạc có kích thước lớn (> 2 mm), mép răng cưa, bề mặt bóng, không lồi, màu nâu hoặc vàng nhạt và không tiết sắc tố ra môi trường nuôi cấy (Bảng 2 và hình 1). Chủng vi khuẩn BS18 sinh trưởng tốt ở nồng độ NaCl 1 - 4%, khi nồng độ muối 5% khả năng sinh

trưởng chủng phát triển yếu. Chủng vi khuẩn BS18 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 25 - 37°C, pH 5 - 9, tối ưu trong vùng pH 6 - 8 và nhiệt độ là 30°C (Bảng 2). Kiểm tra khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng BS18 cho thấy có khả năng sinh cả 4 loại enzym. Như vậy, có thể xếp chủng vi khuẩn BS18 thuộc nhóm ưa ấm và sinh trưởng tốt trong môi trường có pH trung tính.

**Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của của chủng vi khuẩn BS18**

Đặc điểm sinh học	Chủng BS18
Hình thái khuẩn lạc	Hơi tròn, nâu đến vàng nhạt, mép răng cưa
Màu sắc khuẩn lạc	Vàng nhạt
Hình thái tế bào	Que 0,5-0,7 x 1,8-2,5 µm
Sinh catalaza	+
Nhiệt độ sinh trưởng (°C)	25 - 45
Nhiệt độ tối ưu (°C)	30
pH sinh trưởng	5 - 9
pH tối ưu	7,0



**Hình 1. Hình thái khuẩn lạc chủng BS18 trên môi trường LB aga sau 2 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C**

Sinh trưởng ở nồng độ muối (%)	1 - 4
Khả năng thủy phân	
- Cazein	+
- Tinh bột	+
- CMC	+
- kitin	+
Nhuộm Gram	+



Hình 2. Hình thái tế bào chủng BS18 sau 18 giờ nuôi trên môi trường LB ở nhiệt độ 30°C

Bảng 3. Khả năng đồng hóa nguồn các bon, nitơ của chủng vi khuẩn BS18

Nguồn các bon	Khả năng phát triển	Nguồn nitơ	Khả năng phát triển
Đối chứng	-	Đối chứng	-
Rhamnoza	++	Valin	+
Glucosa	++	Tryptophan	++
Fructoza	+	L-Leuxin	+
Trehaloza	+	Methionin	++
Sacaroza	++	Iso-Leuxin	+
Lactoza	++	Lyzin	++
Maltoza	++	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+
Raffinoza	++	NH <sub>4</sub> Cl	+
Myo-Inositol	+	KNO <sub>3</sub>	+

**Ghi chú:** - : Không phát triển; +: Phát triển bình thường; ++: Phát triển tốt

Kết quả thử khả năng đồng hóa một số loại đường cho thấy, chủng vi khuẩn BS18 có khả năng đồng hóa tốt một số loại đường như: Rhamnoza, raffinoza, lactoza, glucosa, maltoza và sacaroza cho khả năng phát triển tốt hơn so với các loại đường như: Trehaloza, Myo-Inositol, fructoza. Chủng BS18 có khả năng sử dụng hầu hết các nguồn nitơ thử nghiệm, tuy nhiên khả năng là không giống nhau. Trong đó, đối với nguồn axit amin là tryptophan, methionin và lyzin chủng BS18 đồng hóa tốt hơn so với các axit amin là: Valin, L-leuzin và isoleuxin. Ngoài ra, khi bổ sung một số nguồn nitơ vô cơ như NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và KNO<sub>3</sub> khả năng đồng hóa của chủng BS18 cũng cho kết quả tương đối tốt.

### 3.3. Phân loại chủng BS18 bằng phương pháp 16S rARN

Phân loại phân tử dựa trên trình tự gen 16S rARN sử dụng cặp mồi đặc hiệu GF1 và GR1 cho đối với chủng vi khuẩn BS18 cho kết quả sau: Gen 16S rARN sau phản ứng PCR, giải trình tự và so sánh với trình tự nucleotit trên đoạn gen 16S rARN tương ứng

trên cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy, chủng BS18 có độ tương đồng cao với các vi khuẩn *Bacillus cereus*.



Hình 3. Cây phân loại của chủng BS18 dựa trên trình tự đoạn gen 16S rARN

Trong đó: GU980765: *Bacillus cereus* Ta4; KF150475: *Bacillus cereus* JN236; KF150496: *Bacillus cereus* JN261; KF601958: *Bacillus cereus* STBc-001; JQ739718: *Bacillus cereus* ULT15; JQ739719: *Bacillus cereus* HVR22; JX987049: *Bacillus cereus* sigaKolc4; JX429824: *Bacillus cereus* SS263; JN377787: *Bacillus cereus* VCRCB540; KC527059: *Bacillus cereus* ASNt11; JX203254: *Bacillus cereus* YAP6; BS18.

Kết hợp giữa đặc điểm sinh học và phân loại dựa trên mức độ tương đồng về trình tự nucleotit của gen 16S rARN của chủng BS18 với các chủng vi khuẩn so sánh trên Genbank, chúng tôi có thể kết luận chủng này thuộc loài *Bacillus cereus* và đặt tên là *Bacillus cereus* BS18. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính proteaza mạnh và khả năng phân hủy lông gà cao đã được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu trước đây [1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14].

### 3.4. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng phân hủy lông gà của chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* BS18

3.4.1. Ảnh hưởng của môi trường

Môi trường nuôi cấy có vai trò rất quan trọng đến sự phát triển và khả năng sinh enzyme của mỗi chủng vi sinh vật. Việc tìm ra môi trường thích hợp sẽ giúp cho chủng vi khuẩn *B. cereus* BS18 sinh

trường, phát triển tốt, sinh enzyme nhiều và phân hủy lông gà tốt hơn. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng phân hủy lông gà được thể hiện ở bảng 4.

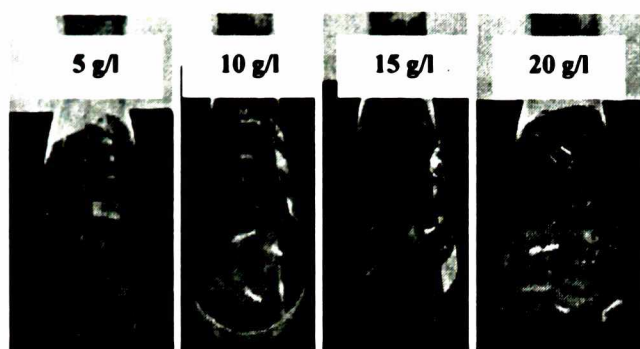
Bảng 4. Khả năng phân hủy lông gà của chủng vi khuẩn *B. cereus* BS18 trên các môi trường khác nhau khi nuôi lắc 180 vòng phút ở nhiệt độ 30°C theo thời gian

Môi trường	Đánh giá về mặt cảm quan theo thời gian (ngày)				Hiệu suất (%)
	1	3	5	7	
LB	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Lông gà bị thủy phân thành các sợi nhỏ.	Lông gà phân hủy mạnh, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ sợi lông gà mùn.	Lông gà phân hủy mạnh gần như hết, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ sợi lông gà mùn.	84,2
MP	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Môi trường chuyển sang đục, lông gà bị thủy phân thành sợi nhỏ.	Lông gà phân hủy mạnh, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ và mùn ra.	Lông gà phân hủy hết, chỉ còn lại các trục các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ và mùn ra.	88,9
GAUSE II	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Màu môi trường chuyển sang đục, lông gà bị thủy phân thành sợi nhỏ.	Lông gà phân hủy mạnh, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ sợi lông gà mùn ra.	Lông gà phân hủy mạnh chỉ còn lại phần lớn các trục chính, các cánh lông bị cắt thành các mảnh nhỏ và mùn ra.	79,3
Khoáng	Lông gà chưa phân hủy, các cánh lông vẫn còn nguyên vẹn.	Màu sắc môi trường vẫn còn trong, các sợi lông gà chưa có hiện tượng phân hủy.	Màu sắc môi trường chuyển sang đục, các sợi lông bắt đầu có hiện tượng phân hủy.	Màu sắc môi trường chuyển sang đục, các sợi lông bắt đầu có hiện tượng phân hủy nhưng với lượng rất thấp.	35,1

Kết quả trên cho thấy, hiệu suất phân hủy lông gà có trong môi trường LB, MP và GAUSE II lần lượt là 84,2, 88,9 và 79,3%; tốt hơn trên môi trường khoáng (35,1%). Như vậy, sự phân hủy lông gà diễn ra mạnh nhất ở môi trường MP, các sợi nhỏ lông gà bị thủy phân hoàn toàn tạo thành dạng mùn nhỏ. Do đó, môi trường MP là môi trường thích hợp nhất cho hoạt động phân hủy lông gà của *B. cereus* BS18. Khi so sánh với một số chủng vi khuẩn khác cho thấy, chủng *B. cereus* BS18 có mức độ phân hủy lông gà chậm hơn chủng *B. subtilis* I-1 nhưng lại nhanh hơn so với các chủng *B. subtilis* 717 và *B. subtilis* 103 sau 72 giờ [4].

3.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ lông gà

Nồng độ lông gà có ảnh hưởng mạnh đến quá trình phân hủy của chủng vi khuẩn *B. cereus* BS18, kết quả được thể hiện ở hình 4. Trong thời gian 5 ngày, ở nồng độ lông gà thấp 5 - 10 g.L<sup>-1</sup>, hầu hết các sợi lông nhỏ đều được cắt rời khỏi trục chính, một phần trong số đó được cắt thành các mảnh nhỏ hơn. Còn ở nồng độ lông gà cao 15 và 20 g.L<sup>-1</sup>, sự phân hủy diễn ra chậm hơn, số lượng lông gà chưa bị phân hủy vẫn còn nhiều. Sau 7 ngày, hiệu suất phân hủy lông gà có nồng độ 5 và 10 g.L<sup>-1</sup> đạt 92,5% và 89,3%, nồng độ 15 và 20g.L<sup>-1</sup> hiệu suất phân hủy mới đạt 71,3 và 57,6%. Như vậy, trong xử lý thực tế với khối lượng lớn thì việc chọn nồng độ lông gà 10 g.L<sup>-1</sup> có thể được chọn để đảm bảo tính kinh tế.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ lông gà đến khả năng phân hủy của chủng vi khuẩn *B. cereus* BS18 khi nuôi lác 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C theo thời gian

3.4.3. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi

Oxy là yếu tố quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển nhóm vi khuẩn hiếu khí. Nếu được cung cấp đủ oxy quá trình sinh trưởng diễn ra nhanh hơn. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi tĩnh và lác

đến quá trình phân hủy lông gà có trong môi của chủng *B. cereus* BS18 đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy, ở chế độ nuôi lác, sau 3 ngày, lông gà đã bắt đầu bị phân hủy và ở thời điểm 5 ngày sự phân hủy mạnh mẽ. Đến ngày thứ 7, số lông gà có trong môi trường gần như phân hủy hoàn toàn (93,5%). Ở chế độ nuôi tĩnh, số lượng lông gà không bị phân hủy vẫn còn khá lớn, mức độ phân hủy lông gà cũng không hoàn toàn mà chỉ tạo thành các màng, hiệu suất 54,1%. Điều này chứng tỏ lượng oxy cung cấp đã có tác động lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển sinh enzyme của chủng *B. cereus* BS18. Do vậy, khi ứng dụng ở qui mô lớn cần phải đặc biệt chú ý đến điều này.

Bảng 5. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi tĩnh và lác đến quá trình thủy phân lông gà của chủng vi khuẩn *B. cereus* BS18, khi nuôi ở nhiệt độ 30°C

Trạng thái nuôi / Thời gian (ngày)	Nuôi tĩnh	Nuôi lác 180 vòng/phút
1	Môi trường chuyển màu, đục, lông gà chưa có hiện tượng phân hủy xảy ra.	Môi trường chuyển màu, đục, một phần các cánh được cắt rời khỏi trục chính.
3	Bề mặt môi trường xuất hiện màng trắng, môi trường đục, sợi lông gà chưa phân hủy.	Môi trường đục, các cánh bị cắt nhỏ, một phần trục chính cũng bị cắt nhỏ, số lượng lông gà phân hủy lớn.
5	Môi trường chuyển sang trong, sợi lông gà chưa bị phân hủy.	Các cánh nhỏ tiếp tục bị phân cắt tạo thành dạng mùn nhỏ, các trục chính bị phân cắt và mùn ra.
7	Các sợi nhỏ bắt đầu rời khỏi trục chính, các sợi nhỏ chưa mùn ra, các trục chính vẫn nguyên vẹn.	Toàn bộ số lượng lông gà phân hủy hoàn toàn, tạo thành mùn.
Hiệu suất (%)	54,1	93,5

4. KẾT LUẬN

Từ 5 chủng vi khuẩn có hoạt tính keratinaza cao, đã chọn được chủng vi khuẩn BS18 có khả năng phân hủy lông gà mạnh nhất.

Khi nghiên cứu phân loại dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá và trình tự gen 16S rARN thì chủng BS18 được đặt tên là *Bacillus cereus* BS18.

Đã nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân hủy lông gà của chủng *B. cereus* BS18 cho kết quả tốt nhất ở môi trường MP, nồng độ lông

gà 10 g.L<sup>-1</sup> và lác 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày, mức độ phân hủy lông gà đạt 93,5%. Kết quả nhận được cho thấy, tiềm năng ứng dụng của chủng BS18 trong phân hủy lông gà ở qui mô lớn có thể tạo ra các sản phẩm giàu axit amin ứng dụng làm phân bón hoặc thức ăn bổ sung cho chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandelli A. (2008). Bacterial keratinase: Useful enzymes for Bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol* 1: 105-116.

2. Charney J., Tomarelli R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *University of the Pennsylvania Hospital- Philadelphia* 501-505.
3. Đặng Thị Thùy Dương, Nguyễn Văn Hiếu, Phạm Thanh Huyền, Khuất Hữu Thanh, Phí Quyết Tiến, Lê Gia Hy (2012). Nghiên cứu sản xuất keratinaza kiềm từ chủng vi khuẩn DS23 phân lập ở Hải Phòng. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 10(2): 335-343.
4. Daniel M. T. Tapia, Maria L. G. Simoes (2008). Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant waste water. *African J. Biotechnology* 7(3): 296-300.
5. Deivasigamani B. , Alagappan K. M. (2008). Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *J. Environ. Biol.* 29(6): 933-936.
6. Kainoor P. S., Naik G. R. (2010). Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus* sp. JB99. *Indian J. Biotechnol.* 9 : 384 – 390.
7. Kim J. M., Lim W. J., Suh H. J. (2001). Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry* 37: 287-291.
8. Lin H. H. , Yin L. J. (2010). Feather meal and rice husk enhanced keratinases production by *Bacillus licheniformis* YJ4 and characters of produced keratinases. *J. Marine Science Technol.* 18 (3): 458-465.
9. Saber W. I. A., El. Metwally M. M., El-Hersh M. S. (2010). Keratinase production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. *Res. J. Microbiol.* 5(1): 21-35.
10. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Staley J. T., Bryant M. P., Pfennig N., Holt J. G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Waverly Press, New York (2): 1501-1589.
12. Swetlana N., P. C. Jain (2010). Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feather. *Brazilian J. Microbiology* 41: 196-200.
13. Tapia D. M. T., Simões M. L. G. (2008). Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African J. Biotechnol.* 7 (3): 296-300.
14. Xu B., Zhong Q., Tang X., Yang Y., Huang Z. (2009). Isolation and characterization of a new keratinolytic bacterium that exhibits significant feather-degrading capability. *African J. Biotechnol.* 8 (18): 4590-4596.

#### SELECTION BACTERIAL STRAIN FOR POULTRY FUR DEGRADABILITY

Dao Thi Hong Van<sup>1</sup>, Nguyen Van Hieu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biotechnology, Hanoi Open University

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

#### Summary

Using microorganisms that have keratinase are preferring in poultry fur treatment, because of high efficiency, its products are used for animal feeds and to make fertilizer for agriculture. 5 high productive keratinase strains were isolated from 150 bacterial studied strains. Between them was found one bacterial strain BS18 that has highest activity for degradation of fur. Classification study based on morphological, physiological, biochemical properties and based on 16S rRNA gene sequencing and showed that BS18 strain has 99% identity with *Bacillus cereus* bacteria. Studied some factors affecting to poultry fur degradation by BS18 strain and the results showed that 93.5% poultry fur were degraded in medium MP with poultry fur ratio 10 g per liter at cultural temperature 30°C in 7 days and 180 rpm.

**Keywords:** *Keratinase, fur keratin, Bacillus, Bacillus cereus.*

**Người phản biện:** PGS.TS. Phạm Văn Toàn

**Ngày nhận bài:** 25/10/2013

**Ngày thông qua phản biện:** 25/11/2013

**Ngày duyệt đăng:** 2/12/2013